

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
der Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. H. Graul

---

Vergleichende tierexperimentelle Untersuchung  
zur Bestimmung des extrazellulären Raumes mit  
verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin  
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Sigrid Pippart, geb. Voegt

aus Hamburg

Marburg 1973

---

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553805\\_0112](https://archive.org/details/IA41553805_0112)

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
der Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. H. Graul

---

Vergleichende tierexperimentelle Untersuchung  
zur Bestimmung des extrazellulären Raumes mit  
verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin  
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Sigrid Pippart, geb. Voegt

aus Hamburg

Marburg 1973

---

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Universität Marburg am 23. Jan. 1973

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. E. Schaumlöffel

Correferent: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                          | Seite |
|----------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                            | 5     |
| II. Problemstellung                                      | 6     |
| III. Material und Methodik                               | 14    |
| a) Versuchsanordnung                                     | 16    |
| b) Probenaufbereitung zur Radioaktivitäts-<br>bestimmung | 17    |
| c) Radioaktivitätsbestimmung                             | 20    |
| IV. Bestimmung des EZR                                   | 25    |
| V. Statistische Auswertung                               | 27    |
| VI. Ergebnisse                                           | 28    |
| VII. Diskussion                                          | 45    |
| VIII. Zusammenfassung                                    | 68    |
| IX. Literaturverzeichnis                                 | 71    |



## I. Einleitung

Die Volumenbestimmungen des extrazellulären Raumes (E Z R) sind für diejenigen Forschungsgebiete von Interesse, die sich mit dem Wasser- und Elektrolythaushalt beschäftigen. Die Kenntnis seiner normalen Größe ist entscheidend, um pathologische Veränderungen feststellen zu können, die zum Beispiel bei Nieren-, Herz-, Leberkrankheiten oder Verbrennungen auftreten (43).

Die heutigen Methoden zur Messung des EZR beruhen auf dem Verteilungsgrad körperfremder Substanzen, von denen angenommen wird, daß sie nicht zellgängig sind. Die zur Untersuchung verwendeten Teststoffe können chemische Substanzen sein, die beispielsweise durch Fällungsreaktionen oder Colorimetrie nachgewiesen werden, oder aber sie sind radioaktiv markiert. Der Vorteil der Verwendung radioaktiv markierter Stoffe - im besonderen mit  $\gamma$ -Strahlern - besteht in dem Fortfall der aufwendigen chemischen Nachweisverfahren und einer viel exakteren Meßgenauigkeit (1). Die Strahlenbelastung ist aufgrund der geringen erforderlichen Aktivität relativ klein. Bei der Anwendung muß jedoch bedacht werden, daß der Stoff in dem betreffenden Organismus keine Veränderung der physiologischen Situation, z.B. Wasserverschiebungen, hervorrufen darf, da dadurch die Meßergebnisse verfälscht werden würden (39)

Frühere Methoden versuchten durch histologische Messungen an Gewebsgefrierschnitten (19) oder aus dem Gesamt-Cl-Bestand

des Organismus - unter der Annahme einer rein extrazellulären Chlorid-Verteilung - die Größe der extrazellulären Flüssigkeit zu erfassen (29)

Ogleich verschiedene Untersuchungsverfahren und zahlreiche Testsubstanzen angewandt wurden, ist man nach wie vor auf der Suche nach einer geeigneten Methode zur Bestimmung des EZR. In dieser Arbeit sollen die im Tierexperiment mit fünf radioaktiv markierten Stoffen ermittelten Ergebnisse der extrazellulären Flüssigkeit miteinander verglichen und diskutiert werden.

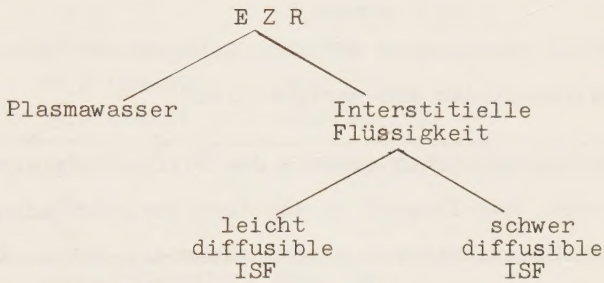
## II. Problemstellung

### 1. Was versteht man unter dem Begriff EZR?

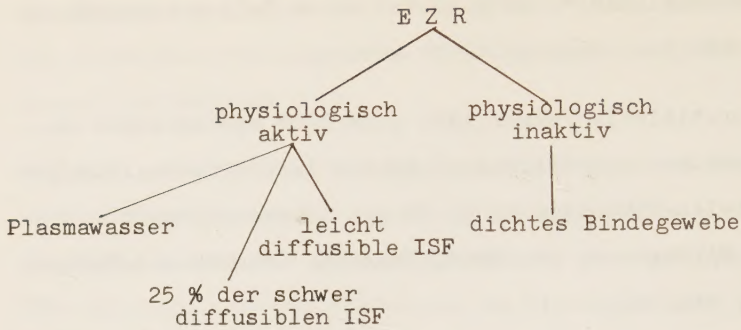
Er umfaßt den Anteil des Körperwassers, der von Zellmembranen eingeschlossen ist. Es setzt sich zusammen aus: a) dem Plasmawasser und b) der interstitiellen Flüssigkeit (12). Das sogenannte "Transzelluläre Wasser", d.h. die Flüssigkeit in den ableitenden Harnwegen, im Gastrointestinaltrakt, in den Drüsenlumina, in der Gallenblase, den Augenkammern, Gelenken und dem Liquor cerebrospinalis, rechnen einige Autoren zum EZR (46, 15, 62), während andere Autoren diesen Raum als eine gesonderte Untergruppe des Gesamtkörperwassers betrachten (12, 48, 23, 61, 34). Dieses transzelluläre Wasser ist zwar nicht in Zellen und laut Definition wäre es

also "extracellulär", doch es ist durch Zellen hindurchgegangen oder von ihnen gebildet worden.

Das interstitielle Wasser läßt sich nach anatomischen Gesichtspunkten unterteilen: a) in die leicht diffusible interstitielle Flüssigkeit, b) in die schwer diffusible im dichten Bindegewebe von Haut, Muskeln, Knochen und Knorpel (50, 13, 12, 46).



Eine andere Art der Unterteilung kann nach funktionellen Gesichtspunkten erfolgen. Es läßt sich ein sog. physiologisch aktives EZR-Volumen von einem inaktiven, träge reagierenden abgrenzen. Zu erstgenanntem zählt das Plasmawasser, die leicht diffusible, interstitielle Flüssigkeit und etwa 25 % der im dichten Bindegewebe gelegenen Wassermenge (46, 50). Dieser Bereich nimmt an allen Schwankungen des Plasmawassers ohne Verzögerung teil (50, 46, 34). Demgegenüber nimmt die schwer diffusible Bindegewebsflüssigkeit nur sehr langsam an Änderungen des intravasalen Wassers teil.



2. Welche Bedingungen muß eine Substanz erfüllen, die zur Bestimmung des EZR geeignet ist?

Sie sollte möglichst schnell das Diffusionsgleichgewicht erreichen, nur langsam in den Harn ausgeschieden, nicht auf anderen Wegen entfernt werden (über die Galle, Schweiß, Faeces usw.) nicht in die Zellen eindringen, im Serum nicht gebunden, nicht gespeichert, nicht metabolisiert werden, nicht osmotisch wirksam und nicht toxisch sein und bei radioaktiven Substanzen darf die physikalische Halbwertszeit nicht zu kurz sein (35, 36, 41, 48, 69, 43, 46, 12, 34).

Bisher ist kein Stoff bekannt, der allen diesen Anforderungen entspricht. In der Literatur findet man eine große Anzahl von Testsubstanzen, großmolekulare Stoffe, Ionen, Kristalloide. Die in Tabelle 1 gegebene Übersicht der verwendeten Stoffe zeigt, daß mit den verschiedenen Methoden recht unterschiedliche Resultate erzielt wurden. Keine von ihnen gibt die wahre Größe, sondern nur gewisse Anteile des extrazellulären Raumes wieder. Deswegen ist es üblich, das Verteilungsvolumen der jeweiligen Testsubstanz nicht als EZR,

Tabelle 1

Testsubstanzen zur Bestimmung des extrazellulären Raumes  
nach Angaben aus der Literatur

| Testsubstanz | EZR in<br>% KG | Autoren                    |
|--------------|----------------|----------------------------|
| Inulin       | 17,5           | NIETH (53)                 |
| Inulin       | 15,6-16,2      | MERTZ (43)                 |
| Inulin       | 16,4           | SCHWARTZ (63)              |
| Inulin       | 15-16          | CORT (12)                  |
| Inulin       | 15,8           | KRUHØFFER (36)             |
| Inulin       | 20 (Hund)      | LEVITT (41)                |
| Inulin       | 18,5 (Hund)    | SWAN (61)                  |
| Inulin       | 19,4 (Hund)    | GAUDINO (24)               |
| Rhodanid     | 21,2           | s. Tabelle bei GAHLEN (20) |
| Rhodanid     | 26,4           | " " " "                    |
| Rhodanid     | 30             | " " " "                    |
| Sucrose      | 18,8-25(Hund)  | SWAN (61)                  |
| Sucrose      | 19             | s. Tabelle bei SCHWAB (62) |
| Saccharose   | 18-21          | s. Tabelle bei CORT (12)   |
| Saccharose   | 21,4           | " " " GAHLEN (20)          |
| Manitol      | 15,9           | SCHWARTZ (64)              |
| Manitol      | 22,6 (Hund)    | SWAN (61)                  |
| Manitol      | 18-23          | CORT (12)                  |
| Cr-EDTA      | 25,6 (Ratte)   | SEIDEL (60)                |
| Thiosulfat   | 16,8           | EDELMANN (14)              |
| Thiosulfat   | 18,1           | NIETH (53)                 |
| Thiosulfat   | 18,3           | ULRICH (67)                |
| Thiosulfat   | 24,4           | CARDOZO (10)               |
| Thiosulfat   | 22,5 (Hund)    | SWAN (61)                  |
| Thiosulfat   | 24             | KRUHØFFER (36)             |
| Sulfat       | 15,2           | WALSER (71)                |
| Sulfat       | 26 (Hund)      | LEVITT (41)                |
| Sulfat       | 22 (Hund)      | SWAN (61)                  |

| Testsubstanz    | EZR in<br>% KG | Autoren                       |
|-----------------|----------------|-------------------------------|
| Thiocyanat      | 24,3           | s. Tabelle bei SCHWAB (62)    |
| Thiocyanat      | 27,5           | s. Tabelle bei HUMMEL (34)    |
| Thiocyanat      | 25,8           | s. Tabelle bei REGENFUSS (58) |
| Na <sup>+</sup> | 31,9           | s. Tabelle bei HUMMEL (34)    |
| Na <sup>+</sup> | 26,0           | s. Tabelle bei HUMMEL (34)    |
| Na <sup>+</sup> | 26,7           | s. Tabelle bei REGENFUSS (58) |
| Cl <sup>-</sup> | 27             | CORT (12)                     |
| Cl <sup>-</sup> | 20-35          | MERTZ 1962 (46)               |
| Cl <sup>-</sup> | 26,2 (Hund)    | GAMBLE (21)                   |
| Br <sup>-</sup> | 20             | MOORE (48)                    |
| Br <sup>-</sup> | 23-31          | KRUHØFER (36)                 |
| Br <sup>-</sup> | 23,3           | LETH (40)                     |
| Br <sup>-</sup> | 23,1           | SCHWARTZ (63)                 |
| Br <sup>-</sup> | 30 (Hund)      | LEVITT (41)                   |
| Br <sup>-</sup> | 30-32 (Hund)   | GAMBLE (21)                   |
| Br <sup>-</sup> | 26,4           | STAFFURTH (66)                |
| Br <sup>-</sup> | 23-29          | CORT (12)                     |

sondern je nach dem zur Messung benutzten Stoff als Inulin-, Cl-, Thiosulfatraum usw. zu bezeichnen.

Die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Stoffe, die sich zum Teil nachteilig auf die Messung des EZR auswirken, erklären, daß mit einigen von ihnen ein zu großer, mit anderen ein zu kleiner EZR erfaßt wird. Je nach Molekulargewicht erfolgt die Durchdringung des extrazellulären Raumes mit verschiedener Schnelligkeit. Von der Größe der Substanz ist auch die Membranpermeabilität und damit der Zelleintritt abhängig. Eine Einbeziehung in den Stoffwechsel des Organismus oder auch

eine Bindung an Plasmaproteine wird eine Verfälschung des extrazellulären Volumens bedingen, da eine echte Verteilung der gesamten injizierten Dosis sich nicht einstellen kann. Erfolgt die Ausscheidung über die Nieren bereits zu einem Zeitpunkt, an dem die Verteilung noch nicht abgeschlossen ist, so wird nicht der gesamte EZR erfaßt werden. Von den in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen werden heute nur noch das Inulin, Thiosulfat, Bromid und Cr-EDTA für EZR-Untersuchungen herangezogen. Die anderen Stoffe haben sich nicht bewährt auf Grund der oben genannten nachteiligen Eigenschaften.

3. Sämtliche Substanzen, die bisher zur Bestimmung der glomerulären Clearance verwandt wurden, verteilen sich sowohl im intra- als auch im extravasalen Raum. Für sie gelten dieselben Anforderungen wie für Substanzen zur EZR-Messung, nämlich ein Konzentrationsausgleich im Verteilungsraum (37, 46). Würden sich die Clearancestoffe ungleichmäßig verteilen, so träte eine große arteriovenöse Konzentrationsdifferenz auf und das Einsetzen des schwankenden venösen Plasmaspiegels in die Clearanceformel  $C = \frac{U \cdot V}{P}$  wäre nicht statthaft.

U = Konzentration der Clearancesubstanz im Urin

V = Harnvolumen

P = Plasmaspiegel

Clearancewerte sind nur zuverlässig, wenn Plasmaspiegel und Verteilungsvolumen unverändert bleiben und dieses wird erreicht, wenn ein Gleichgewicht zwischen intravasalem und interstitiellem Raum eingetreten ist.

4. Zahlreiche Substanzen mit sehr unterschiedlichen Verteilungseigenschaften wurden in den letzten Jahren zur EZR-Bestimmung herangezogen, immer neue Stoffe wurden ausprobiert (siehe Tabelle). Hierdurch wird deutlich, daß bis heute noch kein geeignetes Maß für die Volumenmessung des gesamten extrazellulären Raumes gefunden wurde.

Inulin, das 1948 durch M. GAUDINO (23) zur Messung des EZR eingeführt wurde, gilt in der Literatur gewöhnlich als die sicherste Substanz zur EZR-Volumenmessung (38, 12, 24, 46, 63, 36). Die mit anderen Stoffen erzielten Ergebnisse werden häufig mit den Inulinwerten verglichen und je nach ihrer Übereinstimmung bewertet (37, 61).

Gegen die Anwendung von Inulin bestehen jedoch einige Einwände. Da es ein großes Molekül ist (MG 5100), diffundiert es nur sehr langsam, auf der anderen Seite wird es sehr schnell durch glomeruläre Filtration aus dem Organismus ausgeschieden. Die Anwendung dieser Substanz erfordert eine genaue Ausscheidungskontrolle und eine konstante intravenöse Infusion, durch die die renalen Verluste ausgeglichen werden sollen, damit ein Fließgleichgewicht im Verteilungsraum erreicht wird. Die Infusionsdauer beim erwachsenen Menschen ist lang, in der Literatur findet man Angaben von 6, 12 bis 24 Std., bei ödematösen Patienten sogar noch länger (12, 24, 46, 23). Dadurch verliert diese Methode für die Erfassung von pathologischen Flüssigkeitsansammlungen an Wert.

Da die Inulinraumbestimmung eine recht langwierige Methode ist, besteht der Wunsch nach einem schnellen und einfachen Meßverfahren.

In dieser Arbeit wurden folgende fünf radioaktiv markierte Substanzen verwendet:

1. Inulin- $^3\text{H}$
2.  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA
3. Thiosulfat- $^{35}\text{S}$
4.  $^{82}\text{Br}$
5. Vitamin  $\text{B}_{12}$ - $^{60}\text{Co}$

Diese Stoffe sind teils mit reinen  $\beta$ -Strahlern (Inulin- $^3\text{H}$ , Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ ), teils mit  $\beta$ -Strahlern mit entsprechender  $\gamma$ -Strahlungskomponente bzw. K-Strahlern (Rö-Strahlen) markiert ( $^{51}\text{Cr}$ -EDTA,  $\text{NH}_4^{82}\text{Br}$ , Vitamin  $\text{B}_{12}$ - $^{60}\text{Co}$ ). Diese Substanzen gehören zu unterschiedlichen Stoffgruppen: großmolekulare Stoffe sind Inulin- $^3\text{H}$  und Vitamin  $\text{B}_{12}$ - $^{60}\text{Co}$ , ein mittleres Molekulargewicht weist  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA auf, kleinemolekular ist das Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ , das  $^{82}\text{Br}$  ist ein Ion.

Das Verhalten dieser Stoffe wird sich aufgrund ihrer individuellen Charaktere unterscheiden und sich bei ihrer Verteilung in den verschiedenen Körperflüssigkeitsräumen bemerkbar machen und damit auf die Bestimmung des extrazellulären Raumes auswirken.

Von einigen Autoren werden die in dieser Arbeit benutzten Stoffe auch als Substanzen zur Bestimmung der glomerulären Clearance erwähnt:

Inulin von MERTZ (43), SEIDEL (60), SCHWARTZ (63), STACY (65)  
Thiosulfat von MERTZ (43), GILMAN (25), KOWALSKI (35)  
 $\text{Cr}$ -EDTA von BRIEN (8), KUNI (37), GARNETT (22), CHANTLER (11)  
Vit.- $\text{B}_{12}$  von FOLEY (17), MALMOS (42), OGILVIE (54).

In dieser Arbeit sollen die Ergebnisse der EZR-Größen, die mit den oben genannten fünf radioaktiv markierten Substanzen ermittelt wurden, miteinander verglichen und die Frage untersucht werden, welche Substanz oder welche Substanz-Gruppen den Anforderungen für eine exakte Bestimmung des extrazellulären Raumes am weitgehendsten entsprechen. Neben der Zuverlässigkeit der Substanz zur Erfassung des EZR soll auch der Arbeitsaufwand der einzelnen Methoden im Zusammenhang mit ihrer Aussagekraft kritisch beurteilt werden.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit besteht in der Untersuchung der Größe des extrazellulären Volumens in verschiedenen Organen: Herz, Leber, Lunge, Milz und Gehirn, wobei diese Ergebnisse eine kritische Beurteilung erlauben, ob die verschiedenen Stoffe aufgrund von Speicherung und Anreicherung zur Verfälschung des eigentlichen EZR führen.

### III. Material und Methodik

#### Beschreibung der verwendeten Testsubstanzen:

Die zur Bestimmung des EZR verwendeten Substanzen bezogen wir sämtlich über "Radiochemical Centre, Amersham" aus England, mit Ausnahme von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA, welches wir von der Firma Höchst AG erhielten.

Das Inulin- $^3\text{H}$ , das in gefriergetrockneter Form vorlag, besaß eine spezifische Aktivität von  $40 \mu\text{Ci/mg}$ . Das Molekulargewicht war annähernd 5200.

Tritium ist ein reiner  $\beta$ -Strahler mit der maximalen Energie von  $E_{\text{max}} = 10 \text{ KeV}$  und einer mittleren Energie von  $\bar{E} = 5 \text{ keV}$ . Die physikalische Halbwertszeit beträgt 12,3 Jahre.

Das verwendete Thiosulfat war am inneren Schwefelatom mit  $^{35}\text{S}$  markiert und wurde in gefriergetrockneter Form geliefert. Die spezifische Aktivität betrug  $50 \text{ mCi/mM}$ , das Molekulargewicht 248,19.

$^{35}\text{S}$  ist ein reiner  $\beta$ -Strahler mit  $E_{\text{max}}$  von 180 keV und einer mittleren Strahlungsenergie von  $\bar{E} = 60 \text{ keV}$ . Die Halbwertszeit beträgt 87 Tage.

Diese beiden Substanzen, Inulin und Thiosulfat, müssen also über die niederenergetischen  $\beta$ -Strahler  $^3\text{H}$  und  $^{35}\text{S}$  nachgewiesen werden, was spezielle Meßtechniken voraussetzt.

Die drei anderen in den Versuchen verwendeten Substanzen Cr-EDTA,  $\text{NH}_4\text{Br}$ , Co-Vitamin  $\text{B}_{12}$ , waren mit  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{60}\text{Co}$  markiert. Infolge der Emittierung von  $\gamma$ - bzw. Röntgenstrah-

len unterlagen sie einem weniger aufwendigen Meß- bzw. Probenaufarbeitungsverfahren.

$^{82}\text{Br}$  wurde als Ammoniumbromid in wäßriger Lösung geliefert und besaß eine spezifische Aktivität von 150 mCi/g. Das Molekulargewicht beträgt 96.  $^{82}\text{Br}$  zerfällt über  $\beta$ -Emission mit  $\gamma$ -Komponente.

Die Halbwertszeit ist mit 35,4 Stunden sehr kurz.

$^{60}\text{Co}$  zerfällt über Emission eines Elektrons mit maximaler Energie  $E_{\text{max}}$  0,31 MeV bei gleichzeitiger Aussendung von 2  $\gamma$ -Quanten mit den Energien von 1,17 MeV und 1,33 MeV. Die Halbwertszeit beträgt 5,27 Jahre.

$^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$  wurde gefriergetrocknet geliefert mit einer spezifischen Aktivität von 0,5  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .

Das Molekulargewicht beträgt 1500 (9).

Das bei unseren Untersuchungen verwendete Cr-EDTA war mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert.  $^{51}\text{Cr}$  zerfällt über Elektroneneinfang aus der K-Schale, wobei durch Auffüllen des fehlenden Elektrons durch Elektronen der äußersten Schale in 9 % der Fälle Röntgenstrahlung mit einer Energie von 320 KeV auftritt. Die Halbwertszeit beträgt 27,8 Tage. Das Molekulargewicht ist 343. Das  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA bezogen wir von der Firma Hoechst AG. Es lag mit einer spezifischen Aktivität von ca. 33 mCi pro mg Cr in 0,01 m  $\text{Na}_2$ -EDTA Lösung vor (steril und pyrogenfrei).

Die verschiedenen Strahlungsqualitäten der Testsubstanzen machen unterschiedliche Probenaufbereitungen und Strahlungsnachweise erforderlich.

a) Versuchsanordnung

Als Versuchstiere wählten wir weibliche Wistar-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g (180 g bis 220 g). Für die einzelnen Versuche wurden Tiere möglichst einer Gewichtsklasse verwendet. 5 Gruppen entsprechend der Anzahl der Substanzen zu je 10 Tieren wurden untersucht.

12 Stunden vor Durchführung der Versuche wurde den Tieren die Nahrung entzogen und Wasser nach Belieben angeboten. Am darauffolgenden Morgen wurden während einer Äthernarkose beidseitig die ableitenden Harnwege und Nierengefäße in Höhe des Nierenbeckens unterbunden. Nachdem die Bauchhöhle wieder geschlossen worden war, wurde die Vena femoralis am Oberschenkel freigelegt, die markierte Substanz injiziert und der Hautschnitt wieder vernäht. Damit eine genaue quantitative Überführung der Testsubstanz sichergestellt war, benutzten wir eine 17er Kanüle und eine Tuberculin-Spritze, welche vor und nach der Injektion genau gewogen wurde. Die Differenz, in g gemessen, gibt die in das Tier injizierte Menge in ml an. Nach 2 Stunden wurden die Tiere durch Äthernarkose getötet, das Herz punktiert und 0,5 ml bis maximal 1 ml Blut in eine Spritze mit Thrombocid gezogen. Danach wurden Herz, Leber, Lunge, Milz und Gehirn herausgenommen und die Organe in physiologischer Kochsalzlösung äußerlich gewaschen. Die zur Injektion gelangte Radioaktivität betrug für:

$^3\text{H}$ -Inulin: 5.800.000 Impulse/Min  $\approx 2,6 \mu\text{Ci}$  pro Tier

$^{82}\text{Br}$  : 4.800.000 Impulse/min  $\approx 2,2 \mu\text{Ci}$  pro Tier

$^{51}\text{Cr}$ -EDTA: 5.400.000 Impulse/Min  $\approx 2,5 \mu\text{Ci}$  pro Tier

Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ : 6.700.000 Impulse/Min  $\approx 3 \mu\text{Ci}$  pro Tier

Vitamin  $\text{B}_{12}$ - $^{60}\text{Co}$ : 540.000 Impulse/Min  $\approx 0,25 \mu\text{Ci}$  pro Tier

Die zur Injektion verdünnten Ausgangslösungen der Testsubstanzen dienten zur Herstellung der entsprechenden Standardlösungen, um mit Hilfe der jeweiligen Radioaktivitätsnachweisverfahren die pro Tier applizierte Aktivität zu bestimmen.

#### b) Probenaufbereitung zur Radioaktivitätsbestimmung

Substanzen, die bei radioaktivem Zerfall  $\gamma$ -Strahlung, bzw. Röntgenstrahlen emittieren, wurden in folgender Weise aufgearbeitet:

Das Blut wurde 20 Minuten bei ca. 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, anschließend etwa 1 ml Serum abpipettiert und in spezielle Meßgläschen für den BOHRLOCH-Scintillationszähler gegeben. Die Gläschen wurden leer und gefüllt gewogen, die Differenz in g gibt genau die Probenmenge an, die bei der Radioaktivitätsbestimmung untersucht wurde.

Herz und Milz wurden gewogen und unverändert als gesamte Organe zur Untersuchung in die Meßgläschen gegeben.

Die größeren Organe, Leber, Lungen und Gehirn, wurden insgesamt gewogen, dann homogenisiert (Ultra-Turrax) und aliquote Mengen in die Gläschen eingewogen.

Bei Inulin, das mit Tritium markiert war, mußte aufgrund der niedrigen  $\beta$ -Energie ein besonderes Meßverfahren ange-

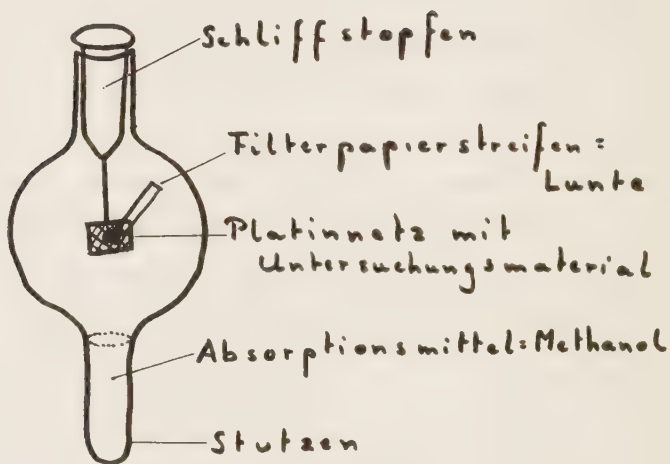
wendet werden, welches eine wesentlich aufwendigere Probenaufbereitung erforderte. Von dem zentrifugierten Blut wurden für 3 Parallelen je 0,1 ml Serum mit Hilfe einer Mikropipette abgehoben und in spezielle Meßgläschen für das Tri-Carb-Spektrometer gegeben. Zunächst wurde zu jeder Serumprobe 0,5 ml Hyamin zugesetzt und für mehrere Stunden bei plus 40° Celsius aufbewahrt. Mit dem Plasmaeiweiß bildete die quarternäre Ammoniumbase eine komplexe Verbindung (58, 67). Die entstehende schlierenfreie, homogene Lösung des Serum-Hyamin-Komplexes wurde mit 15 ml einer 20 %igen äthanolischen Scintillationslösung versetzt. (5 g Omni-fluor<sup>\*)</sup> in 200 ml Äthanol plus Toluol ad 1.000 ml.)

Die Vorbereitung zur Tritium-Bestimmung in den Organen für das Tri-Carb-Spektrometer erfolgte durch Verbrennung aliquoter Teile der Organhomogenate im 1-Liter-Rundkolben im Sauerstoffmedium: 0,05 bis 0,1 g der Homogenate wurden auf dünnem Seidenpapier abgewogen und zusammen mit einem schmalen Filterpapierstreifen, welcher als Lunte diente, in ein Platinnetz eingeklemmt. Dieses ist an dem Schliffstopfen des Rundkolbens angeschmolzen.

Als Vorlage zur Absorption des bei der Verbrennung entstehenden Tritiumwassers wurden in einen am Kolben angeschmolzenen Stutzen 10 ml Methanol gegeben. Der Kolben wurde mit dem Stutzen in einem Dewargefäß mit Trockeneis-Acetongemisch gekühlt. Der Kolben wurde anschließend mit Sauerstoff gespült, die Lunte angezündet und die Probe in den

\*) Firma: NEN Dreieichenhain

## RUNDKOLBEN



Kolben eingeführt und mit dem Schliffstopfen fest verschlossen. Das entstandene  $^3\text{H}_2\text{O}$  kondensierte an der Glaswand. Auf einem besonderen Gestell wurden die Kolben 20 Minuten lang um ihre Zentralachse rotiert, wobei die  $^3\text{H}_2\text{O}$ -Niederschläge auf der Innenwand vom Methanol aufgenommen wurden. 5 ml der methanolischen Absorptionslösung wurden in Meßgläschen gegeben und 10 ml Scintillationsflüssigkeit (5 g Omnifluor in 1.000 ml Toluol) zugegeben.

Bei den Versuchen mit  $^{35}\text{S}$ -Thiosulfat wurden die Serumproben in gleicher Weise wie für Inulin- $^3\text{H}$  beschrieben aufbereitet.

Da bei der Verbrennung von Thiosulfat im Rundkolben  $\text{SO}_3$  und  $\text{SO}_4$  entstehen und sich diese Substanzen am Platingitter festsetzten und beim Schleudern nicht in das Methanol übergehen würden, war diese Methode ungeeignet. Statt dessen wurde etwa 0,01 g der homogenisierten Organe auf einem möglichst kleinen Papierstückchen abgewogen und in die Meßgläschen für das Tri-Carb-Spektrometer gegeben. 1 ml SOLUENE-100<sup>\*)</sup> wurde zugesetzt, so daß diese Proben von dieser starken organischen Base, die biologisches Gewebe zu lösen vermag, bedeckt waren.

Wegen der Aggressivität des Lösungsmittels wurden Meßgläschen aus Glas im Gegensatz zu den sonst verwendeten Plastik-Gläschen verwendet. Um den Color-Quench-Effekt, der durch die Eigenfärbung der Organe zustande kommt und von der Art und Menge des Gewebes abhängt, so gering wie möglich zu halten, wurden so kleine Organmengen genommen.

Nachdem die Gläschen bei  $+40^\circ$  Celsius etwa 6 Stunden stehengelassen wurden und eine vollständige Auflösung des Probenmaterials erfolgt war, wurden 15 ml Scintillationslösung wie beim Serum zugefügt.

#### c) Radioaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Radioaktivität der mit  $\gamma$ -Strahlern markierten Substanzen erfolgte an einem Bohrloch-Meßplatz.

Das Zählgerät besteht aus der Scintillationssonde, dem

<sup>\*)</sup> Firma: PACKARD

Hochspannungsteil, einem Zeiteinschub und einem elektronischen Zählwerk zur Bestimmung der Impulsrate. Die Scintillationssonde besteht aus einem NaJ-Kristall, der mit Thallium aktiviert ist. Der Kristall weist eine zentrale Bohrung auf, in die die Meßgläschen eingebracht werden und somit praktisch eine  $4\pi$ -Geometrie für die Aktivitätsmessung vorliegt. Der Kristall sitzt lichtdicht auf der Photokathode eines Sekundärelektronenvervielfachers. Die Scintillationssonde ist von einer Bleiabschirmung umgeben, um die Einflüsse von Umgebungs- und kosmischer Strahlung so gering wie möglich zu halten.

Die von der Probe abgegebene Energie wird über die Kristallgitter den Thalliumaktivatoren zugeführt, wo eine Umwandlung der Anregungsenergie in Licht erfolgt.

Da der Kristall mit reflektierendem Material umgeben ist, fällt praktisch alles Licht, das bei der Umwandlung der Energie eines  $\gamma$ -Quants im Kristall entsteht, auf die Photokathode. Durch Sekundärelektronenvervielfacher werden die an der Kathode erzeugten Elektronen zu einem Impuls in mV Größenordnung verstärkt, der dann nach weiterer Verstärkung im Zählwerk registriert wird.

Standardlösungen, Organ- und Serumproben werden bis zu einer Mindestimpulszahl von 10.000 gemessen und alle Meßwerte nach Abzug des Nulleffektes auf Impulse pro Minute umgerechnet.

Die Aktivitätsbestimmungen der reinen  $\beta$ -Strahler  $^3\text{H}$ -Inulin

und  $^{35}\text{S}$ -Thiosulfat sind auf Grund der geringen Energien der emittierten Elektronen ( $E_{\text{max}}$  18 bis 180 KeV) nur mit Hilfe einer spezifischen Meßtechnik in befriedigender Weise durchzuführen. Um höchstmögliche Zählausbeuten zu erzielen, kommt nur die Flüssigszintillationsspektrometrie als Nachweisverfahren in Betracht.

Unter Flüssigszintillationsmessung versteht man die homogene Vermischung der radioaktiven Probe in einem primären organischen Lösungsmittel (z.B. Toluol), in dem ein primärer organischer Szintillator molekular gelöst ist. Die von den radioaktiven Atomen emittierten Betateilchen geben einen Teil ihrer Strahlungsenergie an die Moleküle des Lösungsmittels ab, von denen diese Anregungsenergie auf den primären Szintillator übertragen wird. Dabei erfolgt gleichzeitig eine Umwandlung in Licht spezifischer Wellenlänge. Es werden ca. 5 % der Strahlungsenergie in Licht umgewandelt.

Das Meßgläschen mit der in der Szintillationslösung verteilten radioaktiven Probe befindet sich in einer Meßkammer zwischen 2 Photomultipliern. Das emittierte Licht fällt auf Photokathoden dieser Multiplier, von denen die ausgeschlagenen Elektronen auf in Kaskade geschaltete Dioden eines Sekundärvervielfachers fallen und durch die entsprechende Verstärkung zu einem Impuls im mV-Bereich führen.

Da die Photokathoden auf Licht einer spezifischen Wellenlänge optimal ansprechen, ist der Szintillationslösung

ein sekundärer Szintillator zugesetzt, der die Aufgabe hat, das vom Primärszintillator emittierte Licht in eine optimale Wellenlänge (420  $\mu$ ) zu transformieren (wave-length-shifter).

Um das thermische Rauschen der beiden Photomultiplier, das zu einer hohen Zählrate als Nullwert führen würde, zu reduzieren, laufen die Impulse beider Photomultiplier über eine Antikoinzidenzstufe, ehe sie über eine Summationsstufe und Verstärker als Nettozählimpulse registriert werden.

Der Zusatz von Chemikalien, wie zum Beispiel Hyamin und Alkohol als Lösungsvermittler für wässrige aktive Lösungen etc., absorbiert einen mehr oder weniger großen Anteil der primären Strahlungsenergie und wandelt ihn in chemische Energie oder Wärme um. Diese Substanzen führen somit zu einer entsprechenden Verminderung der Zählausbeute. Diese sogenannten Löscheffekte oder Quencheffekte müssen bei der Flüssigszintillationsmessung ermittelt werden, damit alle Meßproben auf eine gleiche Meßeffektivität bzw. auf Zerfälle pro Minute (dpm) korrigiert werden können.

Der von uns verwendete Szintillator Omnifluor besteht zu 98 % aus einem primären Szintillator (PPO) und zu 2 % aus einem sekundären Szintillator (wave-length-shifter). Die Aktivitätsbestimmungen der Substanzen mit  $^3\text{H}$  und  $^{35}\text{S}$  erfolgten unter der angegebenen Art der Probenaufbereitung in einem Dreikanal-Flüssigszintillationsspektrometer (Packard, Modell 3380) mit automatischer Korrektur der Quencheffekte über einen eingebauten Computer mit Hilfe eines externen

Standards (Radium Americium). Die durch external Standard in der Probe entstehenden Compton-Elektronen lösen energieabhängige Impulse der entsprechenden Höhe in mV aus.

In 2 zusätzlichen Kanälen, die einen unterschiedlichen mV-Bereich des gesamten Impulsspektrums erfassen, werden diese Impulse registriert und von dem eingebauten Rechner das Verhältnis der Impulse in beiden Kanälen ermittelt. Dieses Verhältnis beträgt im Idealfall 1,0 und sinkt mit zunehmendem Quencheffekt bis zu einem Wert von 0,01 ab.

Für  $^3\text{H}$  und  $^{35}\text{S}$  werden die entsprechenden Kanäle mit Hilfe der Verstärkung und einer oberen und unteren Diskriminierung des Impulsspektrums eingestellt. Unter Verwendung von  $^3\text{H}$  bzw.  $^{14}\text{C}$ -Toluol werden Meßreihen aufgestellt, die mit steigender Konzentration von Löscheffekten hervorruhenden Substanz versetzt werden. Über den eingebauten Computer und das Kanalverhältnis des externen Standards werden die für den gesamten in Frage kommenden Quenchbereich erforderlichen Korrekturfaktoren so einprogrammiert, daß die vom Gerät ausgegebenen Meßdaten für jede Probe die absolute Aktivität (dpm) angeben.

Da die maximalen Energien von  $^{14}\text{C}$  und  $^{35}\text{S}$  praktisch gleich sind, wurde zur Eichung für die Messung der  $^{35}\text{S}$ -Aktivität  $^{14}\text{C}$ -Toluol verwendet. Unter Verwendung der in den jeweiligen Arbeitsgängen zur Probenaufbereitung eingesetzten Chemikalien wurde der Leerwert bzw. der Nullwert für Fremdaktivitäten und thermische Rauschimpulse bestimmt. Diese Nullwerte wurden dem Gerät eingegeben und automatisch von der je-

weiligen Impulsrate einer Meßprobe in Abzug gebracht.

Das Gerät hatte für  $^3\text{H}$  eine maximale Zählausbeute von 50 % und für  $^{35}\text{S}$  von 90 %.

#### IV. Bestimmung des EZR

Die sowohl über die  $\gamma$ - als auch über die reine  $\beta$ -Messung ermittelten Impulsraten wurden für den Standard auf die injizierte Dosis und für Serum und Organ auf die Impulsrate pro ml bzw. g umgerechnet.

Die Bestimmung des gesamten EZR erfolgte nach dem Verteilungsmodell:

Es wird eine bekannte Menge AB einer Testsubstanz injiziert und die gleichmäßige Verteilung abgewartet. Dann wird Blut entnommen und die Plasmakonzentration der Testsubstanz C bestimmt. Die Plasmakonzentration C multipliziert mit dem unbekannten Volumen X, indem sich die Substanz verteilt hat, muß dann der eingesetzten Menge AB entsprechen.

$$AB = CX$$

$$X = \frac{AB}{C}$$

Übersetzt für unsere Versuche heißt die Formel:

$$\text{EZR}_{\text{gesamt}} = \frac{\text{injizierte Impulsmenge}}{\text{nach 2 Stunden erhaltene Impulszahl in 1 ml Serum}}$$

Der so errechnete Wert kann als Absolutwert in ml angegeben

werden, doch gebräuchlicher Weise wird er auf das Körpergewicht bezogen (siehe Tabelle 1).

Bestimmung des EZR in den einzelnen Organen:

$$\text{EZR}_{\text{Organ}} = \frac{\text{im gesamten Organ gefundene Impulse}}{\text{in 1 ml Serum gefundene Impulse}}$$

Den so erhaltenen Absolutwert des Organ-EZR in ml bezogen wir auf das gesamte Organgewicht.

Bestimmung des Quotienten der relativen spezifischen Aktivität von Organ/Serum:

Wir errechneten die relative spezifische Aktivität (rel. spez. Akt.), indem wir zunächst unsere Meßergebnisse auf spezifische Aktivität (dpm/g bzw. ml Organ bzw. Serum) umrechneten und dann die Mittelwerte bestimmten. Aus der spezifischen Aktivität wurden die rel. spez. Akt. in % nach folgender Formel berechnet:

$$\text{rel. spez. Akt. in \%} = \frac{\text{spez. Akt. (dpm/g Organ bzw. ml Serum)} \times \text{Gewicht des Tieres (g)} \times 100}{\text{applizierte Aktivität (dpm)}}$$

Diese Umrechnung in rel. spez. Akt. hat den Vorteil, daß unterschiedliche Tiergewichte und Applikationsdosen ausgeglichen werden.

Der Quotient der rel. spez. Akt. von Organ/Serum gibt uns Aufschluß darüber, ob eine Anreicherung, ein Zelleintritt der Testsubstanz in einem der untersuchten Organe stattgefunden hat. Werte über 1 sind ein Zeichen für Penetration in die Zelle.

## V. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Aus den gemittelten Werten der einzelnen Aktivitätsmessungen der jeweiligen Organe und des Serums von 10 Tieren einer Versuchsgruppe wurde der Mittelwert  $M$  berechnet.

$$M = \frac{\text{Summe der Einzelwerte}}{\text{Anzahl der Tiere}}$$

Zur statistischen Absicherung des Mittelwertes wurden sowohl der mittlere Fehler des Einzelwertes  $x$  und der mittlere Fehler des Mittelwertes  $\bar{x}$  nach folgender Formel gerechnet.

$$x = \pm \sqrt{\frac{\sum f^2}{n-1}} \qquad \bar{x} = \pm \sqrt{\frac{\sum f^2}{n(n-1)}}$$

$f$  = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert.

Nach den Gesetzen der Normalverteilung besagt  $\bar{x}$ , daß der wahre Mittelwert, den man bei unendlich vielen Messungen erhalten würde, mit einer Wahrscheinlichkeit von 68,34 % innerhalb der Grenzen von  $M \pm \bar{x}$  liegt.

## VI. Ergebnisse

### Gesamter Extrazellulärraum

Die bei unseren Versuchen nach 2 Stunden post injectionem gemessenen Mittelwerte des gesamten EZR, in % des Körpergewichtes angegeben, sind zusammen mit den Standardabweichungen in Tabelle 2 aufgezeichnet. Die Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse in grafischer Darstellung.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Verteilungsräume der 5 Testsubstanzen fällt auf, daß die mit 3 Stoffen, nämlich  $^3\text{H}$ -Inulin (23,82%),  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA (24,16%) und Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  (21,86%), erzielten Mittelwerte annähernd in der gleichen Größenordnung liegen, wobei der Inulin- $^3\text{H}$ - und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-Raum am dichtesten nebeneinander liegen. Die Differenz der mit den 3 Substanzen ermittelten Werte läßt sich nicht durch den mittleren Fehler des Einzelwertes sichern. Zwischen den unterschiedlichen Inulin- $^3\text{H}$ - und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-Werten ist eine Absicherung auch nicht durch den mittleren Fehler des Mittelwertes möglich. Der kleinste EZR wurde durch das Thiosulfatverteilungsvolumen mit 21,86% angegeben, während der höchste Wert bei den  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$ -Versuchen mit 123,6% erzielt wurde. Der  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$ -EZR ist ca. fünfmal so groß wie der Inulinraum. Der ebenfalls große Bromid-EZR (36,45%) ist 1 1/2mal so groß wie der von Cr-EDTA.

## EZR der Leber

Die von uns bestimmten Werte des Leber-Extrazellulär-raumes werden in % des Gesamtorgangewichtes (OG) angegeben und sind in Tabelle 3A aufgezeichnet und zur Anschaulichkeit in Abbildung 2 dargestellt. Die Verhältnisse der relativen spezifischen Aktivität in % von Organ zu Serum werden errechnet, um eine etwaige Anreicherung der Testsubstanz im Organ feststellen zu können. Sie sind in Tabelle 3B aufgeführt.

Bei der Betrachtung wird deutlich, daß der mit  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$  gemessene Leber-EZR einen sehr hohen Wert von 308,64% OG aufweist. Nicht nur bei der Leber, sondern, wie wir noch bei sämtlichen anderen untersuchten Organen sehen werden, fällt auf, daß die mit Vitamin  $\text{B}_{12}$  gemessenen Organ-EZR stets extrem hohe Werte zeigen. Der  $^3\text{H}$ -Inulinraum der Leber ist mit 12,27% am geringsten, gefolgt von dem  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-EZR, der ca. doppelt so groß ist. Der entsprechende mit  $^{82}\text{Br}$  gemessene Wert beläuft sich auf 29,11%. Eine statistische Abwicherung der beiden zuletzt genannten Werte durch den mittleren Fehler des Einzelwertes ist nicht möglich. Der Bromidraum ist nur geringgradig kleiner als der von Thio-sulfat- $^{35}\text{S}$  mit 32,82% (auch hier finden wir keine statistische Absicherung durch den mittleren Fehler des Einzelwertes). Der Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ -Raum beträgt fast das Dreifache des Inulinraumes.

Aus Tabelle 3B ist zu ersehen, daß sicherlich eine Anreicherung des radioaktiven  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$  in der Leber

stattgefunden hat, da das Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität von Organ zu Serum 3,14 beträgt.

### EZR der Lunge

Wie wir aus der Tabelle 4A und Abbildung 3 ersehen wird der Lungen-EZR (in Prozent des Organgewichtes gemessen) durch alle 5 verwendeten Testsubstanzen recht unterschiedlich angegeben. Der Minimalwert wird mit der Inulinmethode (22,55%) erzielt, gefolgt von dem nächst größeren Thiosulfat- $^{15}\text{S}$ -Wert (27,50%). Die Unterschiede dieser Werte lassen sich nicht durch den mittleren Fehler des Einzelwertes statistisch absichern. Der nächst größere Wert wird mit  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA erzielt (39,82%), gefolgt von dem  $^{82}\text{Br}$ -Raum (63,90%).

Wie schon erwähnt, sehen wir, daß der Maximalwert des Lungen-EZR durch die  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$ -Bestimmung erreicht wird. Er beträgt mit 609,55% knapp das Zehnfache des Bromid-Lungen-EZR. Offensichtlich hat auch in diesem Organ eine Anreicherung des Vitamin  $\text{B}_{12}$  stattgefunden, wie Tabelle 4B zeigt.

### EZR des Herzens

Tabelle 5A und Abbildung 4 zeigen die Ergebnisse des EZR des Herzens. Wie wir schon bei den anderen Organen gesehen haben und noch sehen werden, ergaben sich bei den Versuchen mit  $^3\text{H}$ -Inulin die kleinsten (12,82%), bei denen mit Vitamin  $\text{B}_{12}$  die größten Werte (299,96%).

Ordnet man die Verteilungsvolumen der 5 Substanzen der Größe nach, so ergibt sich die gleiche Reihenfolge wie bei

den Untersuchungen der Lungen, beginnend mit dem niedrigsten Wert: Inulin- $^3\text{H}$  (12,82%), Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  (16,65%),  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA (19,97%),  $^{82}\text{Br}$  (26,82%) und schließlich  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$  (299,96%). Die unterschiedlichen Werte zwischen Inulin- $^3\text{H}$  und Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  und zwischen Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA lassen sich nicht durch den mittleren Fehler des Einzelwertes statistisch absichern. Der Bromidraum ist ca. doppelt so groß wie der Inulinraum und dieser wiederum beträgt nur etwa  $2/3$  des Cr-EDTA-Wertes.

Tabelle 5B zeigt bei den  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$ -Versuchen ein Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität Organ zu der des Serums von 2,66, so daß eine Anreicherung im Organ anzunehmen ist.

#### EZR der Milz

Die Ergebnisse der Milzuntersuchungen sind in Abbildung 5 und Tabelle 6A und 6B aufgeführt. Die unterschiedlichen Werte des Inulin und Cr-EDTA-Raumes von 12,01% bzw. 15,21% lassen sich nicht durch den mittleren Fehler des Einzelwertes absichern. Der Thiosulfatraum mit 23,41% ist ca. doppelt so groß, der Bromid-EZR etwa dreieinhalbmals so groß wie der Inulinraum. Vitamin  $\text{B}_{12}$  gibt den extrem hohen Wert von 502,0%, wiederum liegt hier das Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität von Organ und Serum über 1.

#### EZR des Gehirns

Die Tabelle 7A und die Abbildung 6 zeigen die Größen des extrazellulären Raumes im Gehirn.

Wie bei den Organen, Lunge, Herz und Milz, so sehen wir auch bei dem Gehirn, daß der kleinste Raum durch  $^3\text{H}$ -Inulin (1,6%), die beiden größten Werte durch Bromid und Vitamin  $\text{B}_{12}$  (18,91% bzw. 20,79%) angezeigt werden, d.h. der Bromidraum beträgt knapp das 12fache und der Vitamin  $\text{B}_{12}$ -EZR das 13fache des Inulinraumes. Die Differenz der Werte, die mit Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA bestimmt wurden, lassen sich weder durch den mittleren Fehler des Einzelwertes, noch durch den des Mittelwertes statistisch absichern; das gleiche gilt für die Untersuchungen mit  $^{82}\text{Br}$  und  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$ .

Tabelle 7B zeigt, daß keine Substanz eine sichere Anreicherung erfährt.

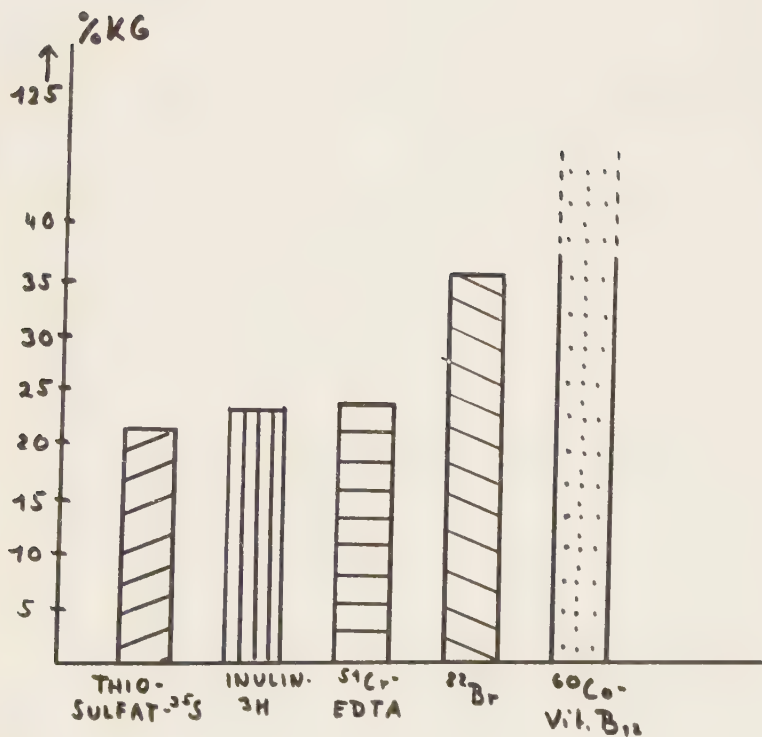
Gesamter Extrazellulärraum

Tabelle 2

| Testsubstanz                        | EZR<br>in % des Körpergew. | x    | $\bar{x}$ |
|-------------------------------------|----------------------------|------|-----------|
| Inulin- $^3\text{H}$                | 23,82                      | 2,55 | 0,44      |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$    | 36,45                      | 1,02 | 0,32      |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA              | 24,16                      | 2,24 | 0,33      |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$         | 21,36                      | 3,10 | 0,63      |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin B $_{12}$ | 123,6                      | 23,3 | 7,00      |

Abbildung 1

## GESAMTER EXTRAZELLULÄRRAUH



E Z R der Leber

Tabelle 3A

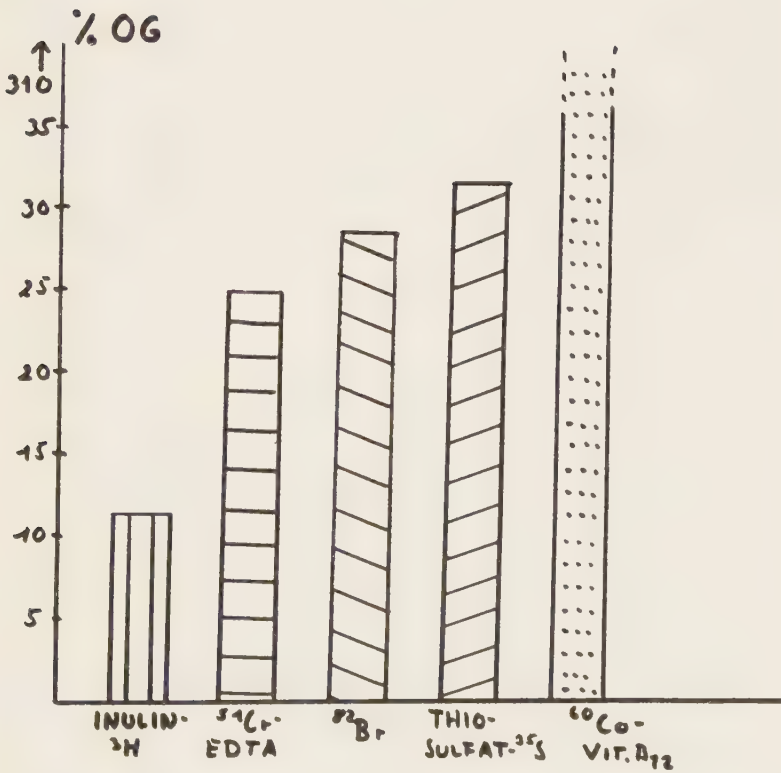
| Testsubstanz                        | EZR<br>in % des Körpergew. | x     | $\bar{x}$ |
|-------------------------------------|----------------------------|-------|-----------|
| Inulin- $^3\text{H}$                | 12,27                      | 1,85  | 0,36      |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$    | 29,11                      | 1,86  | 0,56      |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA              | 25,45                      | 2,85  | 0,76      |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$         | 32,82                      | 4,37  | 0,93      |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin B $_{12}$ | 308,64                     | 32,17 | 10,72     |

Tabelle 3B

| Testsubstanz                        | relative spezifische Aktivität<br>von Organ/Serum |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Inulin- $^3\text{H}$                | 0,126                                             |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$    | 0,296                                             |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA              | 0,237                                             |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$         | 0,731                                             |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin B $_{12}$ | 3,148                                             |

Abbildung 2

## EZR der LEBER



E Z R der Lunge

Tabelle 4A

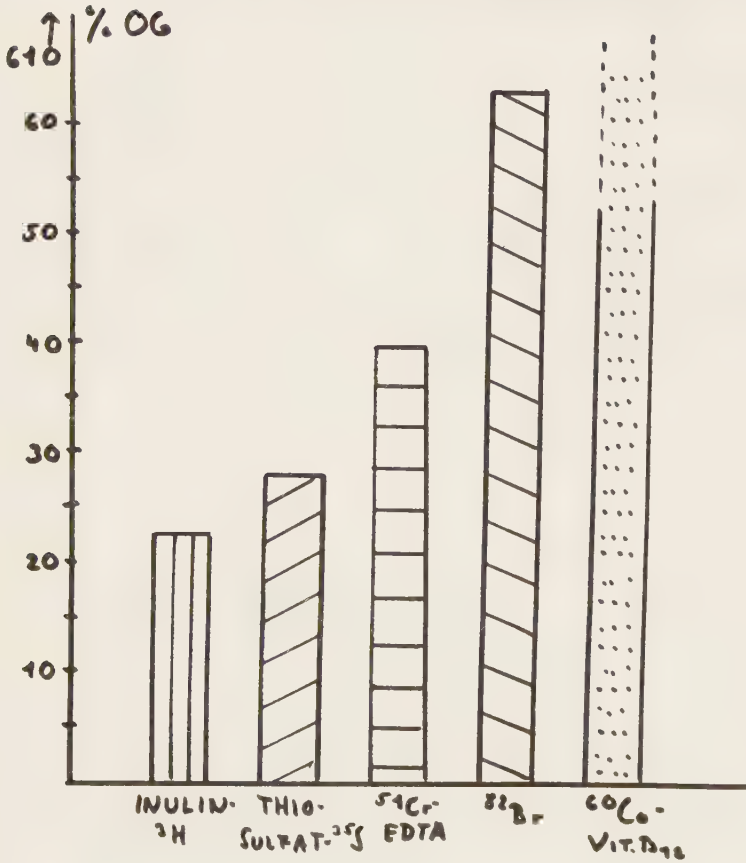
| Testsubstanz                        | EZR<br>in % des Organgew. | x     | $\bar{x}$ |
|-------------------------------------|---------------------------|-------|-----------|
| Inulin- $^3\text{H}$                | 22,55                     | 2,45  | 0,50      |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$    | 63,90                     | 4,31  | 1,36      |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA              | 39,82                     | 2,88  | 0,74      |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$         | 27,50                     | 4,05  | 0,95      |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin B $_{12}$ | 609,55                    | 56,63 | 18,87     |

Tabelle 4B

| Testsubstanz                        | relative spezifische Aktivität<br>von Organ/Serum |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Inulin- $^3\text{H}$                | 0,224                                             |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$    | 0,661                                             |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA              | 0,384                                             |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$         | 0,597                                             |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin B $_{12}$ | 5,802                                             |

Abbildung 3

## EZR der LUNGE



E Z R des Herzens

Tabelle 5A

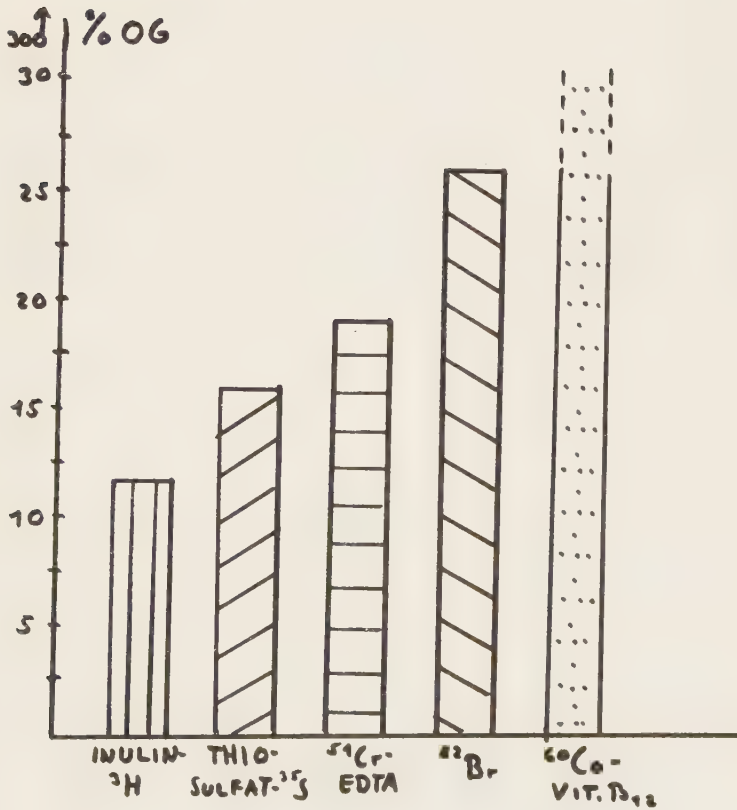
| Testsubstanz                              | EZR<br>in % des Organgew. | x     | $\bar{x}$ |
|-------------------------------------------|---------------------------|-------|-----------|
| Inulin- $^3\text{H}$                      | 12,82                     | 1,52  | 0,34      |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$          | 26,82                     | 2,92  | 0,87      |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA                    | 19,97                     | 1,79  | 0,45      |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$               | 16,65                     | 2,65  | 0,52      |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin $\text{B}_{12}$ | 299,96                    | 35,06 | 11,68     |

Tabelle 5B

| Testsubstanz                              | relative spezifische Aktivität<br>von Organ/Serum |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Inulin- $^3\text{H}$                      | 0,126                                             |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$          | 0,266                                             |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA                    | 0,187                                             |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$               | 0,333                                             |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin $\text{B}_{12}$ | 2,666                                             |

Abbildung 4

## EZR des HERZENS



E Z R der Milz

Tabelle 6A

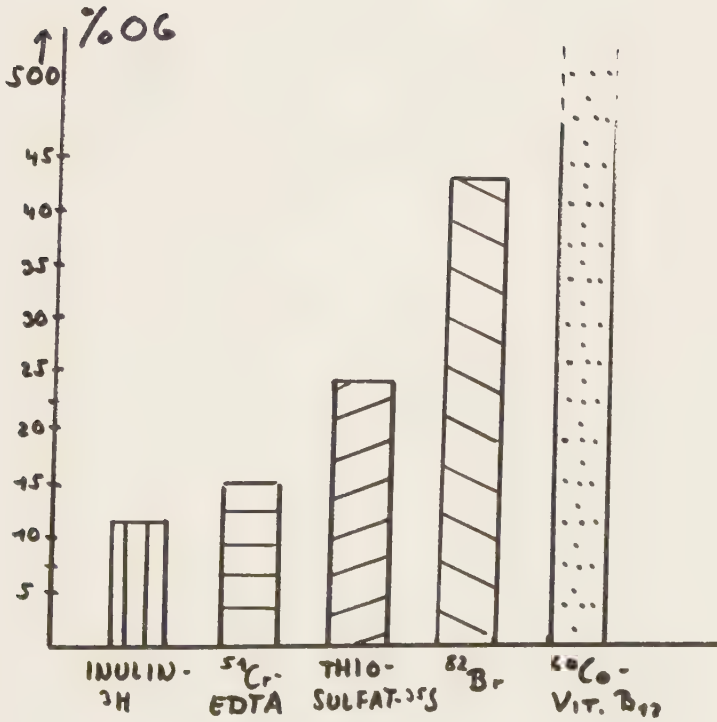
| Testsubstanz                              | EZR<br>in % des Organgew. | x     | $\bar{x}$ |
|-------------------------------------------|---------------------------|-------|-----------|
| Inulin- $^3\text{H}$                      | 12,01                     | 2,20  | 0,52      |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$          | 43,40                     | 1,64  | 0,48      |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA                    | 15,21                     | 1,78  | 0,45      |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$               | 23,41                     | 4,93  | 0,96      |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin $\text{B}_{12}$ | 502,00                    | 30,87 | 10,29     |

Tabelle 6B

| Testsubstanz                              | relative spezifische Aktivität<br>von Organ/Serum |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Inulin- $^3\text{H}$                      | 0,119                                             |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$          | 0,436                                             |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA                    | 0,149                                             |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$               | 0,476                                             |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin $\text{B}_{12}$ | 4,740                                             |

Abbildung 5

## EZR der MILZ



E Z R des Gehirns

Tabelle 7A

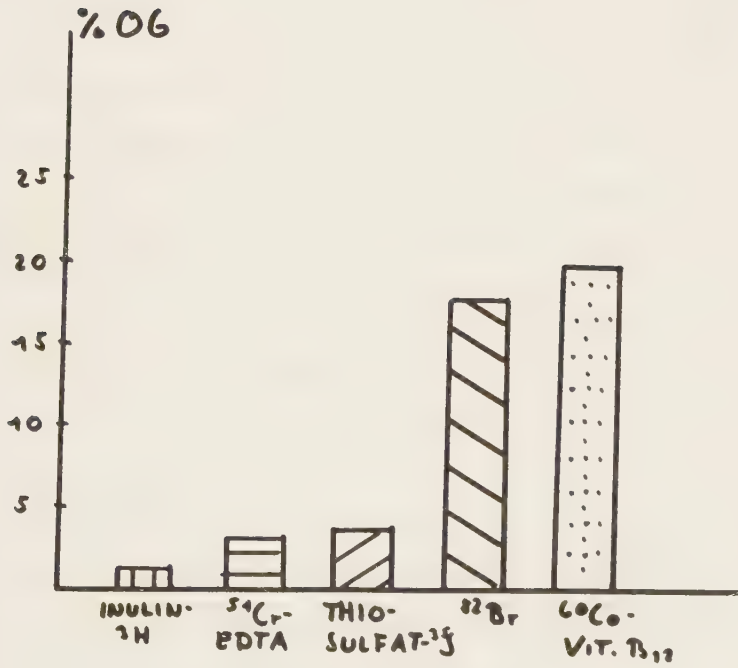
| Testsubstanz                              | EZR<br>in % des Organgew. | x    | $\bar{x}$ |
|-------------------------------------------|---------------------------|------|-----------|
| Inulin- $^3\text{H}$                      | 1,60                      | 0,76 | 0,17      |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$          | 18,91                     | 1,14 | 0,33      |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA                    | 3,20                      | 0,70 | 0,17      |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$               | 3,45                      | 1,93 | 0,38      |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin $\text{B}_{12}$ | 20,79                     | 5,90 | 2,08      |

Tabelle 7B

| Testsubstanz                              | relative spezifische Aktivität<br>von Organ/Serum |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Inulin- $^3\text{H}$                      | 0,016                                             |
| $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$          | 0,191                                             |
| $^{51}\text{Cr}$ -EDTA                    | 0,028                                             |
| Thiosulfat- $^{35}\text{S}$               | 0,064                                             |
| $^{60}\text{Co}$ -Vitamin $\text{B}_{12}$ | 0,185                                             |

Abbildung 6

## EZR des GEHIRNS



## VII. Diskussion

Um die Ergebnisse der Extrazellulärraumgrößen, die bei unseren Versuchen mit den einzelnen Testsubstanzen erzielt wurden, untereinander und mit den Angaben aus der Literatur vergleichen zu können, muß bedacht werden, daß ein Vergleich nur dann eine wirkliche Aussagekraft hat, wenn die Bedingungen, unter denen die Messungen vorgenommen wurden, bei der Beurteilung mit berücksichtigt werden.

Für unsere Versuche wählten wir jeweils die gleichen Voraussetzungen:

1. Die Zeit zwischen Injektion der radioaktiven Substanz und Töten der Ratte betrug bei allen Versuchstieren genau 2 Stunden.
2. Das Körpergewicht der Tiere zwischen den einzelnen Testgruppen und unter den jeweiligen Ratten einer Versuchsreihe schwankte nur in verhältnismäßig geringem Rahmen.
3. Wir wählten weibliche Wistar-Ratten,
4. von annähernd gleichem Alter.

Durch die in der Literatur zu findenden unterschiedlichen Voraussetzungen bei den Messungen des EZR lassen sich zum Teil die Differenzen zwischen den Angaben über das EZR-Volumen trotz gleicher Testsubstanz erklären.

Die Resultate über die EZR-Größen werden von der Verteilungsgeschwindigkeit der Markierungssubstanz beeinflusst und damit von der Zeit, die nach der Injektion bis zum

Töten der Tiere verstreicht. Die Diffusionsgeschwindigkeit wiederum hängt vor allem von der Molekülgröße des Stoffes ab. Unterschiede in den Ergebnissen der EZR-Messungen bei gleicher Testsubstanz könnten also durch zu kurz bemessene Einstellzeiten für ein extrazelluläres Fließgleichgewicht der Testsubstanz bedingt sein.

Die Verteilungszeit der Teststoffe betrug für alle 5 Versuchsreihen 2 Stunden. Wir richteten uns dabei nach Angaben aus der Literatur (69,24,41,2,20 [die Angaben stammen zum Teil von Versuchen an Hunden, Ratten, Pavianen]), wonach diese Zeit auszureichen scheint, damit auch der am langsamsten diffundierende Stoff Inulin ein Fließgleichgewicht erreicht.

Das Körpergewicht als Bezugssystem spielt in der Beurteilung der EZR-Größe insofern eine Rolle, als bei niedrigem Körpergewicht das Plasmavolumen und interstitielle Gewebswasser relativ größer als bei hohem Körpergewicht sind (20). So erklärt sich, daß mit zunehmendem Körpergewicht der absolute Wert der extrazellulären Flüssigkeit steigt, doch bei Bezug auf das Körpergewicht abfällt (44).

Nicht nur von dem Körpergewicht, sondern auch vom Fettgehalt des Organismus, der weitgehend das Körpergewicht bestimmt, ist die Größe des extrazellulären Volumens abhängig. Da das Fettgewebe eines der wasserärmsten Gewebe überhaupt ist, wird verständlich, daß der auf das Körpergewicht bezogene EZR mit zunehmendem Fettgehalt absinkt (12,46,44).

Da die Körperfettlager bei den verschiedenen weiblichen und männlichen Versuchspersonen bzw. Tieren unterschiedlich sind, wird auch die geschlechtsabhängige Differenz der Ergebnisse erklärlich (44).

"Einige Autoren haben innerhalb ihres eigenen Untersuchungsgutes Unterschiede bis zu  $\pm 5$  bis 6 % des Körpergewichtes gefunden. Wiederholte Untersuchungen an ein- und derselben Person haben bessere übereinstimmende Werte ergeben"(20). Durch die oben erwähnten Kriterien läßt sich diese Feststellung erklären.

Im Alter kommt es zu einer Wasserverlagerung vom intra- zum extrazellulären Raum. Im Alter findet man bei Ratten nahezu eine Verdoppelung der extrazellulären Flüssigkeit (44). Wir versuchten Einflüsse des Alters dadurch auszuschließen, daß wir nur ausgewachsene Ratten, die noch keinen Fettansatz zeigten, einer Altersgruppe heranzogen.

Schließlich können auch die unterschiedlichen Methoden bei Anwendung der gleichen Testsubstanz zu Differenzen in den Meßergebnisse führen.

Eine grundsätzliche Frage ist die nach der eventuellen Veränderung der Membranpermeabilität und Zellgängigkeit nach Nephrektomie. WHITE (73) machte entsprechende Vergleiche an Ratten, die 24 Stunden vor Injektion und an solchen, die unmittelbar vor der Injektion nephrektomiert wurden, und stellte dabei keine signifikanten Unterschiede der Permeabilität fest.

Es sollen nun die Ergebnisse der EZR-Größen, die bei unseren 5 Versuchsgruppen ermittelt wurden, besprochen werden.

Bei unseren Untersuchungen mit Tritium markiertem Inulin finden wir nach 2 Stunden post ~~i~~<sup>n</sup>jectionem einen Gesamt-EZR von 23,82% des Körpergewichtes. In der Literatur finden wir lediglich bei WHITE (73) eine Angabe über die mit Inulin gemessene extrazelluläre Flüssigkeit bei Ratten. Dort wurde bei den nephrektomierten Tieren 3 Stunden nach Injektion ein extrazelluläres Volumen von 200 ml pro Kilogramm Körpergewicht bestimmt, das wäre bei 200 Gramm schweren Tieren ein EZR von ca. 20% des Körpergewichtes. Wir finden also eine Differenz in den Resultaten von 3,8%, ein signifikanter Unterschied läßt sich nicht nachweisen. Schwankungen wie diese und größere finden wir auch in der Literatur bei den Untersuchungen mit Inulin an nephrektomierten Hunden. Dort sind Ergebnisse von 16% (41), 16,7% (61), 19,4% (24) und 22,1% (23) des Körpergewichtes ermittelt worden. Bei den Versuchen am Menschen traten ebenfalls beträchtliche Schwankungen auf. Es wurden EZR von 15 bis 21% des Körpergewichtes bestimmt (siehe Tabelle 1). Wir können also sagen, daß unsere Angaben und die von WHITE (73) eine gute Übereinstimmung zeigen.

Für die Größen der Organextrazellulärräume finden wir in der Literatur einige Vergleiche.

Bei den Untersuchungen der Leber finden wir bei unseren Versuchen einen mittleren Wert von 12,27% des Organgewichtes mit einer Standardabweichung des Einzelwertes von 1,8 und des Mittelwertes von 0,3. ADDANKI (2) fand bei männ-

lichen Ratten nach 2 Stunden p.i. einen Leber-EZR von 19% des Organgewichtes, DULCE und GUNTER (nach MERTZ (46). Die Zeit p.i. wird von MERTZ nicht angegeben) einen Wert von 19,2% OG, und WHITE (73) bestimmte 3 Stunden nach Injektion einen Leber-EZR von 186 ml pro Kilogramm Organ, das entspricht bei einem durchschnittlich, 8,5 Gramm schweren Organ einem Wert von ca. 18% des Organgewichtes. Es sind also Ergebnisse, die um etwa 7% höher liegen als die unsrigen.

Vermutlich beruht die deutliche Differenz zwischen ADDANKIS (2) und unseren Messungen auf methodischen Fehlern. Mit der von uns durchgeführten Verbrennungsmethode wird sicherlich die gesamte im Untersuchungsmaterial enthaltene Radioaktivität gemessen. Bei der von ADDANKI (2) angewandten Extraktionsmethode ist zu vermerken, daß bei der Extraktion sicherlich Aktivität zurückbleibt und bei der Proteinfällung mitentfernt wird, was zu einer zu geringen Konzentration im Untersuchungsmaterial bei der Messung führt, wodurch das EZR-Volumen zu groß bemessen wird.

Die ebenfalls höher liegenden Werte, die von WHITE (73) gemessen wurden, lassen sich ebenfalls durch methodische Unterschiede erklären, da auch von diesem Autor nicht die exakte Verbrennungsmethode angewandt wurde. Eine andere Erklärung bietet die längere Verteilungszeit, die der Testsubstanz bei den Versuchen von WHITE (73) zur Verfügung stand. Es ist möglich, daß Inulin nach 2 Stunden den gesamten EZR noch nicht erfaßt hat oder aber in geringem Ausmaß in die Leberzellen eingedrungen ist, was unwahrscheinlich ist. Daß bei unseren Versuchen nach 2 Stunden noch kein

Eintritt und damit Anreicherung in der Zelle erfolgt ist, wird deutlich durch das gebildete Verhältnis von relativer spezifischer Aktivität des Organs zu der des Serums, das 0,126 beträgt.

In der Literatur finden wir nur bei ADDANKI (2) eine Angabe über die Größe des Lungen-EZR bei Ratten, die nach 2 Stunden p.i. bestimmt wurde. Sie beläuft sich auf 35,0% Organgewicht und ist somit deutlich größer als das mit 22,5% von uns gemessene Volumen. Auch in diesem Fall ist genau wie bei der Leberuntersuchung eine einleuchtende Erklärung für die Differenz der Ergebnisse in den methodischen Unterschieden zu finden.

Es läßt sich bei unseren Untersuchungen feststellen, daß der Leber- und der Herz-EZR etwa die gleichen Größenverhältnisse in bezug auf das jeweilige Organgewicht aufweisen, während der Lungen-EZR deutlich über diesen Werten liegt. Die gleichen Verhältnisse der Organ-Extrazellulärräume zueinander wurden von ADDANKI (2) festgestellt. Die von ihm bestimmte extrazelluläre Flüssigkeit im Herzen betrug 19,9% OG, das von uns gemessene Volumen 12,82% des Organgewichtes.

Gute Übereinstimmung der Werte finden wir bei dem Milz-EZR, den wir mit 12,01% ermittelten, während von WHITE (73) ein Wert von ca. 14% 3 Stunden nach Injektion der Markierungssubstanz gefunden wurde.

In der Literatur finden wir keine exakte Angabe über die Größe des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens im Gehirn.

Lediglich MERTZ (46) berichtet, daß der EZR des Zentralnervensystems weniger als 5% des Organgewichtes beträgt. Das von uns bestimmte Ergebnis liegt bei 1,60%.

Für sämtliche 5 Organe bildeten wir das Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität Organ zu relativen spezifischen Aktivität Serum und erhielten Ergebnisse, die zwischen 0,016 beim Gehirn und maximal 0,224 bei der Lunge liegen. Wir sehen also, daß nach 2 Stunden keine Permeation von Inulin in die Zellen stattgefunden hat.

Bei der nun folgenden Besprechung der mit den 4 weiteren markierten Substanzen ermittelten Werte stehen uns nur wenige oder zum Teil sogar überhaupt keine Vergleichsangaben aus der Literatur zur Verfügung.

Bei unseren Versuchen mit  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA bestimmten wir nach 2 Stunden p.i. einen extrazellulären Raum im gesamten Körper der Ratte von 24,16%. Eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Resultat von SEIDEL (60) können wir feststellen, der ebenfalls 2 Stunden nach der Injektion von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA bei gesunden, d.h. nicht nephrektomierten Ratten im "slope"-Verfahren ein extrazelluläres Volumen von 25,62% des Körpergewichtes bestimmte (Extremwerte 22,9 bis 28,45%). Der Autor, der gleichzeitige Versuche mit Inulin vornahm, stellt fest - wie auch wir bei unseren Versuchen -, daß die mit Inulin und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA ermittelten Werte sich weitgehend entsprechen. Die Mittelwerte bei den Inulinversuchen

liegen im Schwankungsbereich der Cr-EDTA-Werte und umgekehrt. Die Differenzen lassen sich also nicht statistisch absichern. VIRGILIO (69), der Untersuchungen an Pavianen vornahm, machte ebenfalls die Feststellung, daß die Inulin- und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-Räume gleich groß sind.

Nur HESSE (31) meint, daß das Verteilungsvolumen von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA kleiner ist als das von Inulin und begründete seine Vermutung durch die Beobachtung einer deutlich kleineren Halbwertszeit der Durchmischung von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA, die auch von KUNI (37) berichtet wird. Doch die kürzere Durchmischungszeit und damit schnellere Einstellung des Fließgleichgewichtes kann ebenso gut durch das geringere Molekulargewicht (MG 5100 gegenüber 343 MG) und somit größere Diffusionsgeschwindigkeit hinreichend erklärt werden.

Die in ihren Größenordnungen vergleichbaren Cr-EDTA- und Inulinräume besagen jedoch nicht, daß auch tatsächlich die gleichen Räume erfaßt werden. So sehen wir beim Vergleich der verschiedenen Organ-Extrazellulärräume, daß nicht in allen Fällen eine so gute Übereinstimmung wie beim Gesamt-EZR nachzuweisen ist. Wir können zeigen, daß der Leber- und Gehirn-EZR doppelt so groß wie der mit Inulin in diesen Organen gemessene Raum ist. Auch der Lungen- und der Herz-EZR sind beträchtlich größer (22,5% gegenüber 39,8% bzw. 12,8% gegenüber 19,9%), während die extrazellulären Räume der Milz keine statistisch gesicherte Differenz bei beiden Substanzen zeigen.

Wie läßt es sich erklären, daß der Gesamtraum beider Test-

substanzen gleich groß ist, während bei dem von uns untersuchten Organ-EZR der  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-Raum jeweils höhere Werte zeigt? Hier gibt uns WHITE (73) einen Hinweis, der bei Ratten feststellte, daß bereits eine halbe Stunde nach der Injektion ein deutlicher Anstieg des Inulinraumes in Haut- und Skelettmuskeln stattfindet, während später nach 6 Stunden erst ein Anstieg in Leber und Milz zu verzeichnen ist. Der Inulin-EZR steigt mit der Zeit in allen Geweben, aber in unterschiedlichem Maße in den verschiedenen Geweben. Das gleiche dürfen wir für  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA annehmen. WHITE (73) sagt in seiner Arbeit, daß die Vergrößerung des Raumes in Haut und Skelettmuskeln durch Eintritt von Inulin in die Zelle zustande kommt. Wir wiederum müssen uns jetzt fragen, ob der mit  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA gefundene größere Wert in den von uns untersuchten Organen durch Zelleintritt der Substanz zu erklären ist oder ob das Inulin zu diesem Zeitpunkt noch nicht weit genug in das interstitielle Gewebe vorgedrungen ist.

In der Literatur finden wir in der Arbeit von BRIEN (8) vermerkt, daß kein Zelleintritt von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA erfolgt, CHANTLER (11) hingegen von einer zu vernachlässigenden Aufnahme in die Zellen spricht, während SEIDEL (60) und VIRGILIO (69) genauere Angaben machen. Ersterer stellte fest, daß nach 24 Stunden der  $^{51}\text{Cr}$ -Gehalt der Organe gering ist (in der Leber beträgt er nur 0,35% der injizierten Dosis, in den Erythrocyten ca. 15% der Gesamt-Blutaktivität). Dieser Anteil ist jedoch in den ersten Stunden zu vernachlässigen. FORLAND (18), PIXBERG (55) und auch GARNETT (22)

konnten während einer kürzeren Untersuchungszeit keinen Übertritt der Substanz in Erythrocyten feststellen. VIRGILIO (69) konnte in keinem Gewebe mehr als 0,5% der injizierten Dosis 24 Stunden nach der Injektion nachweisen. Die Autoren sind sich also einig, daß in den ersten Stunden kein Zelleintritt erfolgt bzw. so minimal ist, daß er sicherlich nicht das Meßergebnis wesentlich verfälschen wird. Wir können ebenfalls bei unseren Versuchen zeigen, daß nach 2 Stunden sicherlich kein die Aussage beeinflussender Zelleintritt von  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  in den Organen aufgetreten ist, da das Verhältnis relative spezifische Aktivität von Organen zur relativen spezifischen Aktivität von Serum jeweils unter 1 liegt (siehe Tabelle 3B - 7B).

Hat Inulin nach zweistündiger Verteilung wirklich den ganzen Organ-EZR durchdrungen? Wir wissen, daß Inulin ein sehr großes Molekulargewicht von 5100 hat (53,23,41) und demzufolge die Diffusionsgeschwindigkeit relativ klein ist (34, 46,53,41,12,36). MERTZ (43,45) sagt zwar, daß das Inulin schnell in die leicht diffusible interstitielle Flüssigkeit eindringt, während es nur langsam in das dichte Bindegewebe von Haut, Muskeln, Knochen und Knorpel diffundiert und dieser Anteil des EZR bei den normalen Untersuchungen meist nicht mit erfaßt wird. Inulin mißt bei den normalen Untersuchungsverfahren nur den physiologisch aktiven Anteil. Es erhebt sich nun die Frage, ob zusätzlich zu dem schwer zu durchdringenden Bindegewebe noch ein weiterer Anteil des EZR in den von uns untersuchten Organen hinzukommt, der nicht mitgemessen wird. Die Vermutung liegt nahe, da wir

auf der einen Seite annehmen müssen, daß das Cr-EDTA mit seinem größeren Verteilungsraum nicht in die Zellen eintritt, zum anderen sehen, daß das Verhältnis relative spezifische Aktivität von Inulin in dem Organ zu dem im Serum unter dem von  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  liegt.

Aus dem bisher über  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  Gesagten können wir entnehmen, daß diese Substanz recht gut für die Bestimmung des Extrazellulär-raumes geeignet ist. Zusätzlich weist dieses Molekül noch weitere positive Eigenschaften auf, die wir von einer "Idealsubstanz" fordern müssen. STACY (65), VORBURGER (70) und VIRGILIO (69) sagen in ihren Arbeiten, daß das Cr-EDTA ebenso wie Inulin inert ist, kein Metabolismus stattfindet, da es unverändert und fast vollständig durch glomeruläre Filtration über die Nieren ausgeschieden wird. HESSE (31) fand 95% der injizierten Dosis im 24-Stunden-Urin wieder. HARTHMUTH-HOENE (27) konnte bereits 6 Stunden nach Injektion bei Ratten und Menschen 95% im Urin nachweisen. Der geringe nicht wiedergewonnene Teil wird von VIRGILIO (69) durch eine statistisch signifikante extrarenale Ausscheidung erklärt, wobei ein geringer intrazellulärer Eintritt angenommen wird.

Der  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ -Komplex ist stabil (37,31,70,68). Es konnte von UTHGENANNT (68) gezeigt werden, daß nach 30 Stunden kein freies Chrom im Körper gefunden werden kann. Das bedeutet, daß eine Verfälschung der EZR-Messung durch Abspaltung des Chroms nicht erfolgt. Auch kein Austausch mit anderen Ionen findet statt und keine Verdrängung durch Schwermetalle. Besonders gefährlich wäre der Austausch mit

Calcium-Ionen, da das Calcium-EDTA zu schweren Schäden des proximalen Tubulusapparates führt, wenn eine Verdrängung des Ca durch Zn, Cu u.a. stattfindet. Eine Verdrängung von Cr aus dem EDTA-Komplex durch Ca ist jedoch aufgrund der niedrigen Ca-Komplex-Konstante nicht möglich (65).  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA ist also nicht nephrotoxisch (68,37,70). Eine geringe unspezifische Bindung an Plasmaproteine, die die Meßergebnisse nicht wesentlich beeinflusst, wird von PIXBERG (55), KUNI (37), UTHGENANNT (68) und STACY (65) beschrieben, während andere Autoren keine signifikante Bindung feststellen können (18,22). Diese Proteinbindung, die STACY (65) mit 2% angibt, wird als Erklärung für die geringere renale Cr-EDTA-Clearance gegenüber der von Inulin herangezogen. Das Clearance-Verhältnis von Chrom zu Inulin beträgt nach STACY (65), HESSE (31) und KUNI (37) 0,95.

Wir sehen also, daß nicht nur bei der Gesamt-Extrazellulär-raumbestimmung mit Inulin- $^3\text{H}$  und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA, sondern auch bei den Untersuchungen der renalen Clearance gute Übereinstimmung herrscht.

Von den oben genannten Autoren wird auf die Vorteile der Verwendung von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA gegenüber der klassischen Methode mit Inulin- $^3\text{H}$  für die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate hingewiesen. Durch die Einführung von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA in die Nierendiagnostik wird sich auf Grund der guten Erfahrungen das slope-Verfahren immer mehr durchsetzen, da es gegenüber den klassischen Methoden mit Dauerinfusion eine wesentlich kürzere Untersuchungszeit am Patienten, keine Wasserbelastung und kein Urinsammeln, sowie einen geringeren

Arbeitsaufwand bei der Aktivitätsbestimmung bietet.

Auch wir kommen auf Grund unserer Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß das  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  eine gute zuverlässige Testsubstanz zur Erfassung des Extrazellulär-raumes ist. Neben der Zuverlässigkeit von  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  muß hervorgehoben werden, daß der Arbeitsaufwand bei der Aufbereitung der Proben und der Aktivitätsbestimmung, auf den wir mehrfach in unserem Kapitel "Material und Methodik" hingewiesen haben, beträchtlich geringer ist als die zeitraubenden Messungen mit dem reinen  $\beta$ -Strahler Inulin- $^3\text{H}$ , so daß wir zu dem Schluß kommen:  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  ist dem Inulin- $^3\text{H}$  für die Bestimmung des Gesamt-EZR vorzuziehen.

Bei unseren Untersuchungen mit Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  ermittelten wir nach zweistündiger Durchmischung ein Verteilungsvolumen von 21,36% des Körpergewichtes. Der Unterschied zu der mit Inulin- $^3\text{H}$  gemessenen EZR-Größe von 23,82% kann nicht statistisch abgesichert werden. Aus der Literatur liegen uns keine Ergebnisse über den Thiosulfat-EZR bei Ratten vor, jedoch lesen wir bei GILMANN (25), der Versuche an Hunden durchführte, einen extrazellulären Raum von 21,3 bis 24,2% des Körpergewichtes. Am Menschen wurden von mehreren Autoren vergleichende Untersuchungen mit der Thiosulfat- und Inulinmethode durchgeführt, wobei ein Teil der Autoren zu der Feststellung kommt, daß sich der Inulin- und Thiosulfatraum weitgehend entsprechen (35,46,10,12), während NICHOLS (50) und RAISZ (56) einen größeren Thiosulfatraum

angeben. Nach NICHOLS (50) beträgt das Verhältnis von Inulin- zu Thiosulfatvolumen, an nephrektomierten Hunden bestimmt, 0,76, während RAISZ (56) ein Verhältnis von 0,79 ermittelte.

Diese verschiedenen Auffassungen der beiden Autorengruppen lassen sich wahrscheinlich zum Teil durch die unterschiedlich langen Untersuchungszeiten erklären. Thiosulfat mit seinem wesentlich kleineren Molekulargewicht von 248 gegenüber dem von Inulin (5100) wird bei gleicher Verteilungszeit viel schneller diffundieren und entsprechend früher sein Fließgleichgewicht erreichen. REGENFUSS (58), NIETH (53), EDELMANN (14) geben an, daß nach 20 bis 30 Minuten bereits ein Verteilungsgleichgewicht eingetreten ist. Würde man nun zu diesem Zeitpunkt den Extrazellulärraum mit den beiden Markierungssubstanzen messen, so ergäbe sich ganz sicher ein unter 1 liegendes Verhältnis zwischen Inulin- und Thiosulfatraum.

Wird man die Untersuchungszeit verlängern, so wird sich Inulin allmählich immer weiter in der interstitiellen Flüssigkeit ausbreiten und je nachdem, wieviel Zeit zur Ausbreitung zur Verfügung steht, auch in das dichte, schwer diffusible Bindegewebe vordringen. Bei Thiosulfat hingegen wird zwar ebenfalls ein Anstieg des Verteilungsvolumens mit der Zeit festgestellt (50), doch scheint hier die Ausbreitung weniger durch die Penetration in das Bindegewebe als durch Eintritt in die Zellen bedingt zu sein. Von vielen Autoren hören wir einstimmig, daß 70 Minuten nach der intravenösen Gabe von Thiosulfat die Substanz in den Ery-

throcyten nachweisbar ist (58,61,46,50,10,35,67). Mehrere dieser Autoren geben ebenfalls an, daß Thiosulfat in Leber-, Muskel-, Nierenzellen frühzeitig eindringt. Auf der anderen Seite lesen wir bei STAFFURTH (66), NICHOLS (50) und CORT (12), daß das Thiosulfat nur äußerst langsam in die Gewebsflüssigkeit des dichten Bindegewebes diffundiert. Würde man also zu einem späteren Zeitpunkt den Inulin- mit dem Thiosulfatverteilungsraum vergleichen, so würde es nicht verwundern, gleich große Verhältnisse vorzufinden, obgleich zwei unterschiedliche Räume erfaßt wurden. Würde man die Untersuchungszeit noch weiter verlängern, so könnte das gleiche Verhältnis wie zu Beginn wieder auftreten, indem Thiosulfat nicht nur einen intrazellulären Flüssigkeitsanteil, sondern jetzt noch zusätzlich einen Bereich des physiologisch inaktiven Anteils des EZR erfaßt hat. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung für den allmählichen Konzentrationsabfall der Substanz im Plasma und damit Anstieg des Verteilungsraumes, wäre die Einbeziehung von Thiosulfat in den Stoffwechsel der Zellen, wie sie von MERTZ (46), NIETH (53) und KOWALSKI (35) beschrieben wird.

Bei unseren Thiosulfatversuchen können wir beobachten, daß das Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität von Organ zu Serum dieses Stoffes in der Leber mit 0,7 deutlich über der der anderen Organe liegt, was besonders bemerkenswert ist, da bei einem Vergleich mit den 4 weiteren Untersuchungsgruppen bei diesen jeweils das Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität der Lunge an erster Stelle steht. Diese Feststellung macht wahrscheinlich, daß ein

intrazelluläres Eindringen in die Leberzellen vorliegt, wie von einigen Autoren (siehe oben) beschrieben wird. Ob ebenfalls ein Zelleintritt in der Milz erfolgt, ist zu vermuten, da das Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität von Organ zu Serum beim Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  ca. 4 mal so groß ist wie bei Inulin.

Bei der Bestimmung des EZR des Herzens und der Lunge stellen wir fest, daß zwischen den Thiosulfat- und Inulinwerten von 16,65% und 12,82% des Herzgewichtes bzw. 27,50% und 22,55% des Lungengewichtes kein statistisch abgesicherter Unterschied besteht. So können wir sagen, daß das Thiosulfat sich ganz sicher nicht gleichmäßig, wie GILMAN (25) annimmt, verteilt, sondern zu einigen Organen eine besondere Affinität zeigt.

Das bedeutet, daß diese Substanz als Clearance-Stoff ungeeignet ist, denn Clearancewerte sind nur zuverlässig, wie wir bereits erwähnten, wenn Plasmaspiegel und Verteilungsvolumen unverändert bleiben.

Aus dem bisher Gesagten müssen wir zu der Annahme kommen, daß der Thiosulfat- und Inulinraum zufällig in ihrer Größe übereinstimmen. Somit wäre der Anreiz da, die EZR-Bestimmung mit dieser Substanz durchzuführen, denn auf Grund der schnellen Diffusion und Einstellung eines Fließgleichgewichtes nach 30 Minuten brauchte nicht eine langwierige Dauerinfusion und damit gefährliche Wasserbelastung durchgeführt zu werden, sondern eine einmalige Injektion würde ausreichen (53,14,34,58). MERTZ (46) spricht sich jedoch

gegen dieses "Schnellverfahren" aus, da Thiosulfat sehr schnell über die Nieren ausgeschieden wird und deshalb seiner Meinung nach niemals zu einer gleichmäßigen Verteilung im EZR kommen kann. Wir möchten auf Grund unserer Beobachtungen ebenfalls unsere Bedenken gegen die Anwendung von Thiosulfat als EZR-Testsubstanz zum Ausdruck bringen. Außerdem muß bedacht werden, daß Thiosulfat-<sup>35</sup>S mit einem reinen  $\beta$ -Strahler markiert ist, dessen Aktivitätsbestimmung bei den Organ-EZR-Messungen fast ebenso aufwendig und zeitraubend ist, wie die von Inulin-<sup>3</sup>H und somit hinsichtlich des Arbeitsaufwandes keinen Vorteil bietet.

Bei unseren Versuchen mit Cobalt-60 markiertem Vitamin B<sub>12</sub> ermittelten wir nach 2 Stunden p.i. einen Gesamt-EZR von 123,6% des Körpergewichtes. Aber nicht nur hier, sondern auch bei den einzelnen Organ-EZR liegen die Werte extrem hoch; außer im Gehirn bestimmten wir Volumina, die weit über 100% des Organgewichtes liegen. Das Vitamin B<sub>12</sub> wurde in der Literatur nicht zur Bestimmung des extrazellulären Raumes herangezogen, sondern vor einigen Jahren als Clearance-Stoff eingeführt. Da an die Testsubstanzen für die Bestimmungen der glomerulären Filtrationsrate, wie wir bereits erwähnten, die gleichen Anforderungen wie die EZR-Teststoffe gestellt werden, wurde das Vitamin B<sub>12</sub> in unsere Untersuchung mit aufgenommen.

Da nach einer einfacheren Methode zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate als die Untersuchung der Inulin-Clearance gesucht wurde, bot sich das <sup>60</sup>Co-Vitamin B<sub>12</sub> an.

Die Aktivität dieses  $\gamma$ -Strahlen emittierenden Stoffes kann leicht und schnell im BOHRLOCH-Kristall bestimmt werden, zudem ist der Vitaminkomplex stabil (26). OGILVIE (54) konnte außerdem zeigen, daß Vitamin B<sub>12</sub> rein glomerulär langsam ausgeschieden und nicht tubulär eliminiert bzw. rückresorbiert wird. Nur sehr geringe zu vernachlässigende Mengen wurden über Galle und Faeces ausgeschieden (42,47).

Der große Nachteil, den diese Substanz aufweist, ist einmal ihre Bindung an Plasmaproteine, wobei dieser Anteil nicht filtriert werden kann (65,59,54,33,26,8,5,6,9). OGILVIE (54) fand bei seinen Versuchen ein Verhältnis von <sup>60</sup>Co-Vitamin B<sub>12</sub> Clearance zu der von Inulin von nur 0,43, bei anderen Autoren fanden wir eine renale Vitamin-B<sub>12</sub>-Clearance von 74% der Inulin-Clearance (42). Die Angaben in der Literatur über den Anteil des gebundenen Vitamins variieren sehr stark von 57% in 24 Stunden bis zu 7% in 72 Stunden (54). OGILVIE (54) stellte fest, daß diese hohe Differenz durch die unterschiedlichen Untersuchungstechniken zum Teil zu erklären sind und kommt zu der Ansicht, daß als Ersatz von Inulin das Vitamin B<sub>12</sub> nur benutzt werden sollte, wenn bei jeder Clearance-Untersuchung die Proteinbindung mit standardisierter Technik gemessen wird. Wichtig ist, daß bei jeder glomerulären Filtrationsratenbestimmung von neuem der Bindungsanteil ermittelt wird, da man sehr stark individuelle und auch bei der gleichen Versuchsperson von einer zur anderen Untersuchung beachtliche Schwankungen registrierte (31,54,5,6).

Zusätzlich zu diesem Nachteil lesen wir bei MALMOS (42), daß sich nach 2 Stunden noch kein Fließgleichgewicht eingestellt hat. In der Veröffentlichung von RETLIEF (58) heißt es, daß eine schnelle Adsorption an der Erythrocytenoberfläche auftritt und nach 20 Minuten bereits die Erythrocyten die maximale Menge aufgenommen haben. Bei unseren Untersuchungen ist es sicherlich in Leber, Lunge, Herz und Milz zu einer Anreicherung der Markierungssubstanz gekommen. Denn wir finden in den genannten Organen jeweils ein Verhältnis der relativen spezifischen Aktivität von Organ zu Serum, das weit über 1 liegt. MILLER (47) konnte bei Körpermessungen in einem Zeitraum von 5 bis 48 Stunden nach der Injektion deutliche Aktivitätsschwankungen über verschiedenen Organen finden. Während die Aktivität über dem Herzen konstant blieb, stieg sie in der Leber an und sank in der Milz ab. Wir können also annehmen, daß sicherlich auch nach mehr als 2 Stunden sich kein Fließgleichgewicht einstellen wird.

Aufgrund der langen biologischen Halbwertszeit, die STACY (65) vor allen Dingen in der Leber feststellte, ist ein weiteres Kriterium gegen die Anwendung von  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$  gegeben, da wiederholte Messungen an ein und derselben Person zur Verfälschung des Ergebnisses führen würden.

Aus unseren Ergebnissen und dem Gesagten ist deutlich geworden, daß  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$  eine ungeeignete Substanz zur EZR-Bestimmung darstellt. Auch die Anwendung als Clearance-Stoff sollte zu großem Bedenken Anlaß geben, da die Voraussetzungen für eine exakte Bestimmung fehlen.

Bei unseren Untersuchungen mit dem Isotop  $^{82}\text{Br}$  bestimmten wir einen Gesamt-EZR von 36,45% des Körpergewichtes. Es liegt uns kein Vergleichswert aus der Literatur vor, doch wir sehen bei den Versuchen an Menschen und Hunden, daß der mit Bromid gemessene Raum ca. 150% des Inulinraumes beträgt. Nehmen wir diesen indirekten Vergleich zur Hilfe, so fällt uns eine gute Übereinstimmung mit unserem Ergebnis auf. Auch bei uns beträgt der Inulinraum  $\frac{2}{3}$  des Bromidraumes.

Betrachten wir weiterhin die mit  $^{82}\text{Br}$  gemessene EZR-Größe der einzelnen Organe und vergleichen sie mit den Ergebnissen der anderen Testsubstanzen Inulin, Cr-EDTA und Thiosulfat, so erkennen wir, daß das mit Bromid gemessene Volumen jeweils das größte ist. Eine Ausnahme bildet der mit Thiosulfat- $^{35}\text{S}$  gemessene Leber-EZR, der den Bromid-EZR geringgradig überragt (die Differenz konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden). Doch in diesem Fall konnte wahrscheinlich gemacht werden (s.o.), daß das Thiosulfat in die Leberzellen eingedrungen ist.

Bedenken wir die geringe Größe dieses Ions, so ist es nicht verwunderlich, daß es infolge seiner hohen Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb von 2 Stunden einen größeren Verteilungsraum als Inulin erfaßt. Es erhebt sich jedoch die Frage, welcher Raum hier durchdrungen und bestimmt wurde. Auf der einen Seite wäre die Größendifferenz darauf zurückzuführen, daß das großmolekulare Inulin nicht oder zumindest sehr langsam in das dichte Bindegewebe vordringt, während das Bromid sehr schnell in diesen Anteil des EZR eintritt. Auf der anderen Seite könnte der Unterschied durch teilweises

Eintreten in den intrazellulären Raum verursacht werden. Die 3. Möglichkeit wäre, daß sowohl ein Zelleintritt als auch eine Ausbreitung im dichten Bindegewebe erfolgt. Dieser letzten Ansicht sind wohl die meisten Autoren (40,46, 66,48,7,50,41).

Die geringe molekulare Größe von  $^{82}\text{Br}$  bietet also den Vorteil, daß sowohl der physiologisch aktive als auch inaktive Anteil des EZR, das heißt das gesamte Extrazellulärvolumen, erfaßt wird und den Nachteil besitzt, daß es in Zellen einwandert und somit einen Raum mißt, der dem Gesamt-EZR plus einem Anteil der intrazellulären Flüssigkeit entspricht.

Von STAFFUTH (66), BRADLEY (7) und MOORE (48) wird berichtet, daß bereits zwei Stunden p.i. im Gastrointestinaltrakt Brom nachgewiesen werden kann. Da wir im Gegensatz zu manchen anderen Autoren diesen nicht zum EZR rechnen können, wir sagen, daß das Bromid den Gesamt-EZR plus einen Anteil des IZR und des Transzellulärenwassers erfaßt.

Ob das Bromid nach 2 Stunden in den von uns untersuchten Organen tatsächlich in die Zellen eingedrungen ist, ist fraglich, denn bei der Betrachtung der Ergebnisse des Leber-Bromid-EZR und den mit Thiosulfat und Chrom-EDTA erzielten Werten erheben sich Zweifel. Die beiden zuletzt genannten Werte zeigen eine statistisch gesicherte Differenz. Der Unterschied zwischen Leber-Thiosulfatraum und -Bromidraum läßt sich nicht statistisch sichern. Da wir bei der Besprechung von Thiosulfat zu der Ansicht gekommen sind, daß die Substanz in die Organzellen wahrscheinlich eingedrungen ist,

müssen wir das gleiche von Bromid annehmen. Andererseits läßt sich die Differenz zwischen Leber-<sup>82</sup>Bromidraum und dem <sup>51</sup>Cr-EDTA-Raum ebenfalls nicht statistisch absichern. Doch sind wir in diesem Fall zu der Ansicht gekommen, daß kein Zelleintritt von <sup>51</sup>Cr-EDTA vorliegt und demzufolge auch ein Eindringen von Bromid nicht in Frage kommen dürfte. Wir stoßen somit auf zwei entgegengesetzte Vermutungen. Eine eindeutige Entscheidung für oder gegen den Zelleintritt in der Leber lassen unsere Beobachtungen nicht zu. Die Verhältnisse der relativen spezifischen Aktivität von Organ zu Serum bei Bromid liegen im Vergleich zu denen von Inulin beträchtlich höher und die Differenzen zwischen den Verhältnissen sind sehr unterschiedlich, was auf örtliche Verschiedenheiten im Verteilungsprozeß hinweist. Auch hier müssen wir uns wie beim Gesamt-EZR fragen, ob die unterschiedlichen Resultate darauf beruhen, daß mit Inulin zu dem Zeitpunkt des Tötens der Ratten nicht die ganze extrazelluläre Flüssigkeit im Organ erfaßt wurde, während Bromid in alle Teile vorgedrungen ist, oder aber daß Inulin den gesamten Organraum erfaßt hat, während Bromid in die Zellen eingedrungen ist. Es kommen jedoch auch beide Möglichkeiten in Frage.

Mit STAFFURTH (66) möchten wir annehmen, daß der wahre EZR, sowohl des Gesamt-Körpers als auch der einzelnen Organe zwischen dem Inulin- und Bromidraum liegt.

Könnte man entsprechende Korrekturen für das in Zellen eingetretene, über den Urin ausgeschiedene und in den Gastrointestinaltrakt eingedrungene Bromid durchführen, so wäre die Substanz der beste Indikator für den wahren EZR (50).

Weitere Vorteile dieser Substanz sehen wir darin, daß sie nicht metabolisiert, langsam ausgeschieden wird und zudem ein  $\gamma$ -Strahler ist, das heißt, eine einfache Aktivitätsbestimmung im BOHRLOCH-Szintillationskristall erlaubt. Es sind jedoch einige erhebliche Nachteile zu erkennen. MOORE (48), MERTZ (46) und BRADLEY (7) stellten unabhängig voneinander fest, daß ein Fließgleichgewicht erst nach 24 Stunden im Menschen erreicht wird und demzufolge eine lange Untersuchungszeit nötig ist.

Die Bestimmung des wahren EZR mit der Bromid-Methode wird also durch mehrere unbedingt erforderliche Korrekturen kompliziert.

Ist es eigentlich für die klinische Diagnostik so entscheidend, den wahren EZR, d.h. den physiologisch aktiven, leicht diffusiblen und den physiologisch inaktiven, träge reagierenden Anteil des EZR zu bestimmen? MERTZ (45) gibt uns die Antwort: Die Meßbarkeit des physiologisch aktiven Volumens der extrazellulären Flüssigkeit ist von besonderer Bedeutung, "da sich in ihnen akute qualitative und quantitative Stoffwechseländerungen ohne größeren Verzug widerspiegeln und extrazelluläre Volumenschwankungen hauptsächlich auf diesen sogenannten physiologisch aktiven Anteil der extrazellulären Flüssigkeit beschränkt sind."

Blicken wir auf das Besprochene zurück, so finden wir unter den 4 Testsubstanzen nur eine, die sich mit Inulin messen kann. Das  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA erfüllt annähernd die Bedingungen für eine gute Methode zur Extrazellulär-Raum-Messung. Sie scheint

sich weitgehend gleichmäßig und ausschließlich im EZR zu verteilen, wobei wir annehmen müssen, daß sie ähnlich wie Inulin, wahrscheinlich sogar genauer vornehmlich den physiologisch aktiven Anteil erfaßt, da die Größen des Gesamt-EZR beider Methoden übereinstimmen. Die  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-Methode ist der Messung mit  $^3\text{H}$ -Inulin vorzuziehen, da sie ein einfaches, schnelles Meßverfahren erlaubt.

### VIII. Zusammenfassung

1. Mit 5 radioaktiv markierten Substanzen wurden bei je 10 Ratten Gesamt-EZR und Organ-EZR (Leber, Lunge, Herz, Milz, Gehirn) bestimmt. Die verwendeten Testsubstanzen (Inulin- $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA, Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ ,  $\text{NH}_4$ - $^{82}\text{Br}$ ,  $^{60}\text{Co}$ -Vitamin  $\text{B}_{12}$ ) sind in der Literatur als Substanzen zur Bestimmung des EZR und als Clearance-Stoffe bekannt.

#### 2. $^{51}\text{Cr}$ -EDTA

Der Gesamt-EZR zeigte gute Übereinstimmung mit dem Inulin- $^3\text{H}$ -Gesamt-EZR. Die Organ-EZR lagen bei Leber, Gehirn, Lunge und Herz deutlich höher, bei der Milz etwa gleich hoch wie bei den Inulin- $^3\text{H}$ -Bestimmungen. Eine Penetration von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA in Zellen ist unwahrscheinlich, da die Quotienten der spez. Konzentrationen von Organ/Serum unter 1 lagen und nur geringgradig größer waren als die

bei den Inulin- $^3\text{H}$ -Bestimmungen. Inulin scheint nicht den gesamten Organ-EZR zu erfassen, während wir dieses für  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  aufgrund des kleineren Molekulargewichtes annehmen.

### 3. Thiosulfat- $^{35}\text{S}$

Der Gesamt-EZR stimmte gut mit dem Inulin- $^3\text{H}$ -EZR überein. Diese Übereinstimmung kann jedoch nach unserem Erachten nur als zufällig angesehen werden. Eine gleichmäßige Verteilung im EZR kann angezweifelt werden, da die Quotienten der spez. Konzentrationen Organe/Serum auffällig große Differenzen aufzeigten. Ein Zelleintritt in Leber und Milz ist wahrscheinlich, da die Quotienten der spez. Konzentrationen von Organ/Serum gegenüber den Inulin-Werten sehr hoch waren. (Angaben aus der Literatur weisen ebenfalls auf Zelleintritt hin.)

### 4. Vitamin $\text{B}_{12}$ - $^{60}\text{Co}$

Gesamt-EZR und Organ-EZR (Ausnahme: Gehirn) zeigten extrem hohe Werte (über 100% KG bzw. OG). Die Quotienten der spez. Konzentrationen von Organ/Serum lagen weit über 1 (Ausnahme: Gehirn), so daß sicherlich eine Anreicherung vorliegt und somit ein Teil des IZR bei dieser Methode mitgemessen wird.

### 5. $\text{NH}_4$ $^{82}\text{Br}$

Sämtliche  $^{82}\text{Br}$ -Werte lagen deutlich höher als die Inulin- $^3\text{H}$ -,  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ - und Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ -Werte (Ausnahme: der Thiosulfat- $^{35}\text{S}$ -Leber-EZR). Die Quotienten der spez. Konzentrationen von Organ zu Serum waren bei den  $^{82}\text{Br}$ -Versuchen gegenüber denen mit Inulin- $^3\text{H}$  sehr viel größer, lagen jedoch unter 1. Eine Zellpenetration kann mit Sicher-

heit angenommen werden.

6. Nach unserer Auffassung ist  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA eine geeignete Substanz zur Messung des EZR. Sie scheint sich gleichmäßig und ausschließlich im EZR zu verteilen, wobei sie vornehmlich - ebenso wie Inulin- $^3\text{H}$  - den physiologisch aktiven Anteil des EZR erfaßt. Aufgrund des einfachen und schnellen Meßverfahrens ist die  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA- der Inulin- $^3\text{H}$ -Methode vorzuziehen.

# IX. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ADAM, W.E. u.a.: Untersuchung zur Bestimmung des Glomerulusfiltrats mit radioaktivem Inulin.  
Klin. Wschr. 45 (Aug. 1967) 818
- 2 ADDANKI, S. u.a.: Rapid determination of extracellular space with Inulin-<sup>3</sup>H.  
Atomlight No.61, July 1967
- 3 ANGHILERI, L.J.: The binding of EDTA to human serum albumin.  
Naturwissenschaften 55 (Apr. 1968) 182
- 4 BAETHMANN, A. u.a.: The Thiosulfate (<sup>35</sup>S) space in the CNS of rats after ventriculo-cisternale perfusion.  
Pflügers Arch. 316 (1970) 51-63
- 5 BEAL, R.W. u.a.: Studies of the plasmaprotein binding of radioactive vitamin B<sub>12</sub>.  
J. Lab. Clin. Med. 63 (1964) 969
- 6 BEAL, R.W. u.a.: Serumprotein binding of vitamin B<sub>12</sub>.  
Scand. J. Haemat. Suppl. 10 (1969) 1-39
- 7 BRADLEY, J.E.S. u.a.: Estimation of extracellular fluid volume using <sup>82</sup>Br.  
Biochem. J. 62 (1956) 33 P
- 8 BRIEN, T.G. u.a.: Cr-EDTA in the determination of glomerular filtration rate.  
Acta Radiol. [Ther] (Stockh.) 8 (Dec.69) 523
- 9 BUBLITZ, G. u.a.: Der Radio-Vitamin B<sub>12</sub>-Resorptions-Urinexkretions-Test (Schilling-<sup>12</sup>-Test).  
Roentgenpraxis 17 (1964) 77
- 10 CARDOZO, R.M., EDELMANN, I.S.: The volume of distribution of sodium thiosulfate as a measure of the extracellular fluid space.  
J. Clin. Invest. 31 (1952) 280
- 11 CHANTLER, C. u.a.: Glomerular filtration rate measurement in man by the single injection methods using <sup>51</sup>Cr-EDTA.  
Clin. Sci. 37 (Aug. 1969) 169
- 12 CORT, J.H., FEND, V.: Physiologie der Körperflüssigkeiten.  
Gustav Fischer Verlag Jena 1958
- 13 COTLOVE, E. u.a.: Mechanism and extend of distribution of Inulin and Sucrose in Chloride spaces of tissues.  
Amer. J. Physiol. 176 (1954) 396

- 14 EDELMANN, I.S. u.a.: Body composition studies in the human being by dilution principle.  
Science 115 (1952) 447
- 15 EDELMANN, I.S. u.a.: Anatomy of body water and electrolytes.  
Amer. J. Med. 27 (1959) 256
- 16 FELLINGER, K., VETTER, M.: Radioaktive Isotopen in Klinik und Forschung.  
Vorträge vom Gasteiner Internationalen Symposium 1954, Urban & Schwarzenberg München-Berlin 1955
- 17 FOLEY, T.H., JONES, N.F., CLAPHAM, W.F.: Renal clearance of  $^{57}\text{Co}$ -Cyanocobalamin. Importance of plasma-protein binding.  
Lancet 2 (1966) 86
- 18 FORLAND, M., PULLMANN, T.N., LAVENDER, A.R.: The renal excretion of ethylenediaminetetraacetate in the dog.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 153 (Juli 1966) 142
- 19 FENN, W.O.: Physiol. Rev. 16 (1936) 450  
nach MERTZ, D.P. (43)
- 20 GAHLEN, W., RÖTTGER, H.: Über die Relation zwischen Körpergewicht und extrazellulärer Flüssigkeit.  
Klin. Wschr. 36 (1958) 951
- 21 GAMBLE, J.L., ROBERTSON, J.S.: Volume of distribution of radioactive Chloride in dogs; Comparisons with Sodium, Bromide and Inulin spaces.  
Amer. J. Physiol. 171 (1952) 659
- 22 GARNETT, E.S., PARSONS, V., VEAL, N.: Measurement of glomerular filtration-rate in man using a  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA-Complex.  
Lancet 1 (1967) 818
- 23 GAUDINO, M. u.a.: Inulin volume of distribution as a measure of extracellular fluid in dog and men.  
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 68 (1948) 507
- 24 GAUDINO, M., LEVITT, M.F.: Inulin space as a measure of extracellular fluid.  
Amer. J. Physiol. 157 (1949) 387
- 25 GILMAN, A., PHILIPS, F.S., KOELLE, E.S.: The renal clearance of thiosulfate with observations on its volume distribution.  
Amer. J. Physiol. 146 (1946) 348
- 26 HAAS, V., PRELLWITZ, W.: Probleme, Methodik und Ergebnisse der single shot  $^{57}\text{Co}$ -cyanocobalamin-Clearance.  
Strahlentherapie 131 (Dez. 1966) 612

- 27 HARMUTH-HOENE, A.E. u.a.: Vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung von ÄDTA und DTPA im Urin der Ratte.  
Strahlentherapie 134 (Sept.1967) 110
- 28 HASE, U., REULEN, H.J. u.a.: Die Bestimmung des extrazellulären Raumes in verschiedenen Arealen des Hundehirns mit Na-<sup>35</sup>S-Thiosulfat.  
Pflügers Arch. 307 (1969) 114
- 29 HASTINGS, A., EICHELBERGER, L.J.: Biol.Chem. 117(1937) 73 nach MERTZ, D.P. (43)
- 30 HAWLICZEK, F.: Neuere Fortschritte auf dem Gebiete der Meßtechnik (aus Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung).  
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1955
- 31 HESSE, L., LUDWIG, M., UTHGENANNT, H.: Untersuchung mit <sup>51</sup>Cr-EDTA zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.  
Fortschr. Med. 85 (1967) 876
- 32 HESSE, L. u.a.: Clearance Bestimmung bei fallendem Plasmaspiegel mit <sup>51</sup>Cr-EDTA.  
Atompraxis 10 (1967) Direct Informat.
- 33 HOM, B. u.a.: Plasma clearance of <sup>57</sup>Co labelled vitamin B<sub>12</sub> bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 23 (1969) 201
- 34 HUMMEL, T.: Gesamtkörperwasser und Extracellularraum bei Herzinsuffizienz.  
Inaugural-Dissertation 1966 Tübingen
- 35 KOWALSKI, M.J., RUTSTEIN, D.D.: The distribution of thiosulfate ion with respect to normal human serum and red blood cells and its application to "extracellular fluid" determination.  
J. Clin. Invest. 31 (1952) 370
- 36 KRUHØFER, R. u.a.: Inulin as an indicator for the extracellular space.  
Acta Physiol. Scand. 11 (1946) 516
- 37 KUNI, M., GRAUL, E.H.: <sup>51</sup>Cr-EDTA. Grundsätzliches zur Einführung einer neuen Substanz zur nuklearmedizinischen Bestimmung der glomerulären Clearance.  
Atompraxis 12 (1966) Direct Inform.
- 38 LADEFOGED, J.: Inulin as measure of extracellular space.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 23 (1969) 145
- 39 LAMERTON, L.F. u.a.: Grundsätzliches zur Anwendung von radioaktiven Isotopen beim Menschen mit besonderer

Berücksichtigung der Probleme der Strahlen-  
biologie.  
aus "Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung",  
Urban und Schwarzenberg Verlag, München-Berlin  
1955, Sonderband 33

- 40 LETH, A., BINDER, C.: The distribution volume of  $^{82}\text{Br}$  as  
a measurement of the extracellular fluid volume  
in normal persons.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25 (1970) 291
- 41 LEVITT, M.F., GAUDINO, M.: Measurement of body water  
compartments.  
Amer. J. Med. 9,2 (1950) 208
- 42 MALMOS, B. u.a.: The determination of glomerular filtra-  
tion-rate in clinical practice.  
Lancet 1 (1966) 943
- 43 MERTZ, D.P.: Kritische Betrachtungen über das Problem der  
Körperflüssigkeitsmessung beim Menschen.  
Klin. Wschr. 34 (1956) 887
- 44 MERTZ, D.P.: Über die Beziehungen zwischen Körperfettge-  
halt und physiologisch aktivem Anteil der extra-  
cellulären Flüssigkeit.  
Z. klin. Med. 156 (1959) 51
- 45 MERTZ, D.P.: Die schnelle Verteilungsphase von Inulin als  
Parameter für das physiologisch aktive Volumen  
der extracellulären Flüssigkeit.  
Z. klin. Med. 156 (1959) 35
- 46 MERTZ, D.P.: Die Extracelluläre Flüssigkeit. Biochemie  
und Klinik.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1962
- 47 MILLER, A., CORBUS, M.F., SULLIVAN, J.F.: The plasma dis-  
appearance, excretion and tissue distribution of  
 $^{60}\text{Co}$  labelled vitamin  $\text{B}_{12}$  in normal subjects and  
patients with chronic myelogenous leukemia.  
J. Clin. Invest. 36 (1957) 18
- 48 MOORE, F.D. u.a.: Reference Models from Clinical Studies  
by Isotope Dilution.  
Annals of Surgery 168 (1968) 671
- 49 NEWMAN, E.V. u.a.: The renal clearance of Thiosulfate  
in man.  
Bull. Johns Hopkins Hosp. 1946, 229
- 50 NICHOLS, G. u.a.: The direct measurement of the extra-  
cellular phase of tissue.  
J. Clin. Invest. 32 (1952) 1295

- 51 NICHOLSON, J.P., ZILVA, J.F.: Estimation of extracellular fluid volume using Radiobromine.  
Clin. Sci. 19 (1960) 391
- 52 NICHOLLS, J.G., WOLFF, D.E.: Distribution of  $^{14}\text{C}$ -labeled Sucrose, Inulin and Dextran in extracellular spaces and in cells of leech central nervous system.  
J. Neurophys. 30 (1967) 1574
- 53 NIETH, M.: Flüssigkeitsräume bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz.  
Z. klin. Med. 156 (1960) 314
- 54 OGILVIE, R.I., RUEDY, J.: Determination of glomerular filtration rate with  $^{57}\text{Co-B}_{12}$  and plasma protein binding of cyanocobalamin.  
Cand. J. Physiol. Pharmacol. 47 (1969) 349
- 55 PIXBERG, H.U. u.a.: Bestimmung des Glomerulusfiltrates bei fallendem  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  Plasmaspiegel.  
Strahlentherapie 136 (1968) 700
- 56 RAISZ, L.G., YOUNG, M.K., STINSON, I.T.: Comparison of the volumes of distribution of Inulin, Sucrose and Thiosulfate in normal and nephrectomized dogs.  
Amer. J. Physiol. 174 (1953) 72
- 57 RAJEWSKI, B.: Strahlendosis und Strahlenwirkung.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1956
- 58 REGENFUSS, P.: Untersuchungen der Wasserräume - Gesamtkörperwasser und Extrazellulärraum - und Histologie bei 10% Verbrennung an Hunden.  
Inaugural-Dissertation, Marburg 1968
- 59 RETLIEF, F.R., GOTTLIEB, C.W., HERBERT, V.: Mechanism of vitamin  $\text{B}_{12}$  uptake by erythrocytes.  
J. Clin. Invest. 45 (1966) 1907
- 60 SEIDEL, A., VOLF, V.: Totale Plasmaclearance von  $\text{Na}[^{51}\text{Cr-ADTA}]$  und Inulin- $^{14}\text{C}$  bei Ratten.  
Experientia 26 (1970) 1325
- 61 SWAN, R.C., MADISSO, M., PITTS, R.F.: Measurement of extracellular fluid volume in nephrectomized dogs.  
J. Clin. Invest. 33 (1954) 1030
- 62 SCHWAB, M. u.a.: Der Einfluß des Alters auf die Flüssigkeitsräume des Körpers.  
Klin. Wschr. 41 (1963) 1173
- 63 SCHWARTZ, I.L. u.a.: The measurement of extracellular fluid in man by means of a constant infusion technique.  
J. Clin. Invest. 28 (1949) 1117

- 64 SCHWARTZ, I.L. u.a.: Comparison of the volume of distribution, renal and extrarenal clearance of Inulin and Mannitol in man.  
J. Clin. Invest. 29 (1950) 517
- 65 STACY, B.D.: Chromium-51-EDTA for estimation of glomerular filtration rate.  
Science 152 (1966) 1076
- 66 STAFFURTH, J.S., BIRCHALL, I.: The measurement of the extracellular fluid volume with radioaktive Bromine.  
Clin. Sci. 19 (1960) 45
- 67 ULRICH, H.J.:  $^3\text{H}$  und  $^{35}\text{S}$  zum Studium des Gesamtkörperwassers und extrazellulären Raumes von Patienten mit Niereninsuffizienz verschiedener Genese.  
Inaugural-Dissertation Marburg 1963
- 68 UTHGENANNT, M., HESSE, L., FORSTER, W.: Die nuklearmedizinische Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate mit  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA.  
Fortschritt Röntgen. Nuklearmed. 109 (1968) 360
- 69 VIRGILIO, R.W. u.a.: Comparison of Inulin and Chromium EDTA spaces in the nephrectomized baboon.  
J. Surg. Res. 10 (Aug. 1970) 370
- 70 VORBURGER, C. u.a.: Vergleichende Studie zwischen den renalen Clearances von  $\text{Na Cr}_2^{51}\text{Cr}$ -EDTA, Inulin und Natrium-Thiosulfat beim Menschen.  
Klin. Wschr. 47 (1969) 415
- 71 WALSER, M., SELDIN, R.W., GROLLMAN, A.: An evaluation of radiosulfate for the determination of the volume of extracellular fluid in man and dogs.  
J. Clin. Invest. 32 (1953) 299
- 72 WEIR u.a.: The distribution of  $\text{Br}^-$  and  $\text{Cl}^-$  in tissues and body fluids.  
J. Biol. Chem. 129 (1939) 547
- 73 WHITE, H.L., ROLF, D.: Whole body and tissue Inulin and Sucrose space in rat.  
Amer. J. Physiol. 188 (1957) 151

Herrn Prof. Dr. Dr. E. H. Graul danke ich für die Überlassung der Arbeitsplätze.

Herrn Prof. Dr. E. Schaumlöffel danke ich für die Anleitung und Hilfe beim experimentellen Teil der Arbeit und für hilfreiche Hinweise und Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit sowie für die Übernahme der Vorkorrektur und des Hauptreferates.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Fräulein Clausnitzer und Frau Mülverstedt danke ich für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

## Lebenslauf

Am 15.9.1945 wurde ich als drittes Kind des Hochschullehrers Prof. Dr. med. H. Voegt und seiner Ehefrau Gretchen, geb. Schultz, in Hamburg geboren.

Von 1952-56 besuchte ich die Volksschule, von 1956-65 das Helene-Lange-Gymnasium in Hamburg, wo ich am 12.2.1965 das Abitur bestand. 1964 besuchte ich vom 1.1.-31.4. die Woking-County-Grammar-School in Surrey/England.

Mein Studium begann ich in Marburg, wo ich bis zum Physikum 1967 blieb. Das erste klinische Semester verbrachte ich an der Universität in Wien, das zweite in Hamburg und kehrte dann nach Marburg zurück, wo ich am 28.1.1971 das Staatsexamen ablegte.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich an der Universitätskinderklinik in Marburg und am Städt. Krankenhaus in Neunkirchen/Saar auf der Chirurgischen Abteilung. Zur Zeit bin ich im Städt. Krankenhaus in Schwäbisch Gmünd auf der Inneren Abteilung beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

an der Philipps-Universität Marburg/Lahn:

Petry, Kamke, Vogt, Walcher, Dimroth, Seidel, Mann, Rohen, Mahr, Witzel, v.Stosch, Hensel, Karlson, Zilliken, Goldammer, Spiegelberg, Bruck, Golenhofen, Wiegant, Schmid, Koransky, Linneweh, Rodeck, Buchholz, Pots, du Mesnil de Rochemont, Berendes, Siegert, Kreutz, Schleyer, Schirren, Hupe, Jacob, Straub, Schmitz-Moormann, Graul, Schaumlöffel, Bommer, Exner, Voss, Hildebrandt, Hamm, Ganz, Prinz, Dölle, Stohmeyer, Martini, Hardewig;

an der Universität in Wien:

Chiari, Obiditsch-Mayer, Fellinger, Hoff, Husslein, Gitsch, Artner, Hruby, Langer, Kuscko;

an der Universität in Hamburg:

Seifert, Kracht, Bartelheimer, Schäfer, Althoff, Ehrengut, Thomsen, Papst, Nickol.







